Clássicos em Doença de Chagas

história e perspectivas no centenário da descoberta

José da Rocha Carvalheiro
Nara Azevedo
Tania C. de Araújo-Jorge
Joseli Lannes-Vieira
Maria de Nazaré Correia Soeiro
Lisabel Klein

organizadores

EDITORA FIOCRUZ

história e perspectivas
no centenário da descoberta

história e perspectivas no centenário da descoberta

José da Rocha Carvalheiro
Nara Azevedo
Tania C. de Araújo-Jorge
Joseli Lannes-Vieira
Maria de Nazaré Correia Soeiro
Lisabel Klein
organizadores

Capa, projeto gráfico e editoração eletrônica
Adriana Carvalho Peixoto e Carlos Fernando Reis

Fotos

Capa: detalhe de Carlos Chagas na foto intitulada "Conselho Técnico da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro". Rio de Janeiro, 1933. Arquivo da Casa de Oswaldo Cruz (COC/Fiocruz).

Quarta capa: da esquerda para a direita, "Hematofagia em perspectiva", de Gutemberg Brito; "Montanhas vivas", de Helene Barbosa e Rubem Menna Barreto; "*Triatoma tibiamaculata*: um vetor negligenciado da doença de Chagas mostra a sua cara", de Cleber Galvão – respectivamente, segundo, primeiro e terceiro lugares no concurso Centenário da Descoberta de Chagas: um toque de arte, promovido pelo comitê organizador do centenário.

Revisão e copidesque
Irene Ernest Dias e M. Cecilia G. B. Moreira

Normalização bibliográfica
Clarissa Bravo

Biografias dos autores dos textos clássicos
Ana Maria M. Palma e Pamela Lang

Catalogação na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde/Fiocruz
Biblioteca de Saúde Pública

C614 Clássicos em Doença de Chagas: histórias e perspectivas /. Carvalheiro, José da Rocha (Org.) ... [et al.] – Rio de Janeiro, RJ : Editora FIOCRUZ, 2009.

556 p. il., tab., graf.

ISBN: 978-85-7541-174-2

1. Doença de Chagas-história. 2. Doença de Chagas-transmissão. 3. Trypanosoma cruzi-parasitologia. I. Título.

CDD – 616.9363

2009
Editora Fiocruz
Av. Brasil, 4036 – 1º andar – sala 112 – Manguinhos
21040-361 – Rio de Janeiro – RJ
Tels.: (21) 3882-9039 e 3882-9041
Telefax: (21) 3882-9006
http://www.fiocruz.br/editora
e-mail: editora@fiocruz.br

Organizadores

José da Rocha Carvalheiro

Professor titular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), presidente da Associação de Pós-Gradução em Saúde Pública (Abrasco), membro do International Advisory Board do International Clinical Trials Registry Platform, Organização Mundial da Saúde (ICTRP/OMS). Vice-presidente de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) de julho de 2007 a janeiro de 2009.

Nara Azevedo

Pesquisadora titular em saúde pública, professora do Programa de Pós-Graduação em História das Ciências e da Saúde da Casa de Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz (COC/Fiocruz), diretora da COC/Fiocruz.

Tania C. de Araújo-Jorge

Pesquisadora titular em saúde pública, diretora do Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Joseli Lannes-Vieira

Pesquisadora titular em saúde pública, pesquisadora do Laboratório de Biologia das Interações do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), coordenadora do Programa Integrado de Doença de Chagas (PIDC/Fiocruz).

Maria de Nazaré Correia Soeiro

Pesquisadora titular em saúde pública, pesquisadora do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), coordenadora do Programa Integrado de Doença de Chagas (PIDC/Fiocruz).

Lisabel Klein

Tecnologista titular em saúde pública, assessora da Presidência da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Sumário

Prefácio

Em 1909, Carlos Chagas anunciou a descoberta de uma nova doença: a tripanossomíase humana, doença de Chagas. A descoberta representou não apenas uma contribuição inovadora para o campo da medicina tropical, em particular os estudos sobre as doenças parasitárias, mas também mostrou a realidade sanitária e social do interior do país, assolado pelas endemias rurais.

Cem anos depois nos deparamos com uma valiosa oportunidade de reflexão sobre os múltiplos sentidos e implicações da comemoração do grande feito de Carlos Chagas, que, tal como na biografia do cientista, associam ciência, saúde pública e projetos para a nação. Comemorar, 'lembrar junto', significa, assim, refletir sobre as várias temporalidades imbricadas nesta data: a memória de um passado que engendrou o presente e convida a pensar os desafios do futuro. A história, tecendo os fios de um tempo construído por tantos indivíduos e gerações ao longo destes cem anos, apresenta-se como caminho para congregar todos aqueles que se associam a este legado e pretendem compartilhá-lo entre as novas gerações.

Diante deste cenário e do atual quadro epidemiológico de uma enfermidade que ainda afeta milhões de pessoas em toda a América Latina, evidencia-se a importância de se articular ações que permitam suprir as lacunas relacionadas ao conhecimento da doença de Chagas e às medidas efetivas para tratamento e controle.

Os textos reunidos neste livro constituem um importante marco nesse sentido. *Clássicos em Doença de Chagas: história e perspectivas no centenário da descoberta* lança nova luz sobre os estudos da doença a partir da reunião de 15 artigos científicos comentados por renomados pesquisadores, especialmente convidados para esta homenagem. Estamos diante de um valioso acervo documental que esperamos possa estimular o avanço do conhecimento e, assim, contribuir para a busca de soluções dos problemas sociais e de saúde relacionados à enfermidade de Chagas.

Paulo Gadelha
Presidente da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Apresentação

A Fundação Oswaldo Cruz orgulha-se de apresentar esta publicação, especialmente concebida para celebrar o centenário de uma das mais significativas contribuições científicas para o conhecimento biomédico e para a saúde pública: a descoberta da doença de Chagas pelo ilustre cientista de Manguinhos, Carlos Chagas.

Nascido em 9 de julho de 1878 na Fazenda Bom Retiro, próximo à cidade de Oliveira, em Minas Gerais, Carlos Chagas desde cedo revelou seu interesse pela área médica, formando-se em 1903 pela Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro. Já havia desenvolvido importantes pesquisas sobre a malária, no Instituto de Manguinhos, e chefiado duas campanhas de combate à doença, quando foi designado por Oswaldo Cruz para ir ao norte de Minas Gerais combater um surto de malária que prejudicava a expansão da Estrada de Ferro Central do Brasil, obra que se integrava ao projeto de modernização do país. Nesse contexto, instalado em um vagão ferroviário em Lassance e contando com poucos recursos técnicos, Chagas deixou que sua arguta capacidade de observação e a prática rigorosa do método científico, de coletar e analisar dados, o conduzissem a este fato inédito na história da medicina: a descoberta de uma doença até então desconhecida, seu agente etiológico parasitário, seu vetor de transmissão, e o subseqüente estudo da sintomatologia clínica (nas fases aguda e crônica) e da patogenia da doença, dos reservatórios silvestres do parasito e, também, dos determinantes sociais da enfermidade. De fato, esse brilhante e único feito está relacionado à excelente formação médica de Chagas tanto na área clínica quanto na prática da medicina experimental, assim como à sua prévia atuação como pesquisador em áreas da biologia de vetores e biologia de parasitos.

Para celebrar essa relevante descoberta científica, que inaugurou uma tradição de pesquisa no país, reunimos neste livro 15 artigos publicados por eminentes cientistas. A republicação em fac-símile destes originais tem como propósito oferecer às atuais gerações uma seleção de trabalhos que contribuíram decisivamente para o avanço da pesquisa e para o controle da doença nas Américas. Procuramos focalizar, nesta seleção, a doença humana e a experimentação, abordando questões que configuram as principais áreas temáticas de investigação médico-científica, identificadas a partir da descrição da doença de Chagas: patologia, ecoepidemiologia, saúde pública e estratégias de controle, biologia do parasita e seus hospedeiros, diagnóstico e terapêutica.

A identificação destes trabalhos baseou-se em consulta feita à Comissão Científica da Fiocruz, à qual solicitamos a indicação de até dez referências fundamentais consideradas

clássicas em suas respectivas áreas de conhecimento. Ainda que a resposta à consulta tenha nos indicado 277 trabalhos, publicados até 2008, selecionamos os 15 mais citados e publicados entre 1909 e 1968, por entendermos que nesse largo período se estabeleceram as questões fundamentais relativas à doença, as quais, a partir de então, foram abordadas de distintas maneiras, sobretudo mediante as novas tecnologias oferecidas pela biologia celular e molecular, aplicadas à imunologia, à patologia e à epidemiologia.

Com o objetivo de proporcionar ao leitor uma apreciação destas contribuições, situando-as em seu contexto de produção e seus desdobramentos subseqüentes, solicitamos a um grupo de pesquisadores da Fiocruz que, juntamente com especialistas convidados de outras instituições, elaborassem um comentário sobre cada um destes trabalhos. Para contextualizar o conhecimento sobre a doença de Chagas e sobre as formas de mitigar seus efeitos, três textos iniciais abordam diferentes aspectos a ela relacionados: os estudos paleontológicos; a dimensão histórica e social da descoberta; as ações do presente e os desafios futuros da pesquisa.

Após cem anos dessa descoberta ímpar, há muito o que celebrar, registrando-se significativos desenvolvimentos inovadores no campo da produção de conhecimentos científicos e tecnológicos, bem como no terreno do controle da transmissão pela via vetorial e por transfusão de sangue, com a redução de novos casos. Não obstante tais avanços, fruto de um esforço coletivo, esta silenciosa e negligenciada parasitose ainda impõe inúmeros desafios para os cientistas e governantes dos países em desenvolvimento, para os quais representa um elevado custo social por inutilizar e ceifar vidas.

A realização deste livro só foi possível graças à inestimável colaboração dos comentaristas que aceitaram o desafio, bem como do Comitê Consultivo das Comemorações do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas e da Comissão Científica do Simpósio Internacional sobre a Descoberta. Agradecemos o excelente trabalho realizado pelos profissionais da Editora Fiocruz e, ainda, aos cientistas, seus herdeiros e editores dos periódicos que gentilmente permitiram a republicação dos artigos originais que compõem esta obra.

Os organizadores

Antes de Carlos Chagas: paleoparasitologia da infecção por *Trypanosoma cruzi*

Adauto Araújo
Departamento de Endemias Samuel Pessoa
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fiocruz

Ana Maria Jansen
Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Luiz Fernando Ferreira
Departamento de Ciências Biológicas
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fiocruz (pesquisador emérito)

O povoamento das Américas é assunto ainda controverso, apesar do crescente acúmulo de dados arqueológicos. Em que pesem as datações para os sítios da América do Norte, há outras tão antigas na América do Sul, o que confunde propostas de migrações e de rotas que percorreram os antigos colonizadores. Diferentes ramos da ciência buscam contribuir para aumentar o conhecimento sobre os primeiros povos que chegaram ao continente e aqui se estabeleceram. O fato é que esses grupos pré-históricos, seja por que caminho usaram, encontraram um novo ambiente com constituintes físicos e biológicos novos, com os quais passaram a conviver. Ao longo do processo migratório, espécies de parasitos perderam-se por não se adaptarem às condições ambientes, enquanto outras permaneceram no hospedeiro humano (Araújo, Reinhard & Ferreira, 2008); outras ainda foram adquiridas na conquista de novos espaços e contato com novos hospedeiros (Araújo *et al.*, 2008).

Existe uma longa história entre a descoberta da nova doença por Carlos Chagas e sua existência em populações pré-históricas. A infecção por *Trypanosoma cruzi* foi comprovada na população Chinchorro da costa do Pacífico há 9.000 anos (Aufderheide *et al.*, 2004) e aqui no Brasil, em grupos pré-históricos de Minas Gerais, há 7.000 anos (Lima *et al.*, 2008); na

América do Norte foi descrito um caso em corpo mumificado, datado de 1.150 anos. Estes achados apontam novas perspectivas para o conhecimento sobre a origem e evolução das relações parasito-hospedeiro-ambiente, no caso da doença de Chagas, além de assinalar sua ampla dispersão pelo continente americano.

PEQUENA INTRODUÇÃO HISTÓRICA

Oswaldo Cruz organizou expedições de cientistas pelas regiões menos conhecidas do país. Assim foi que pesquisadores de Manguinhos partiram do Rio de Janeiro para o interior do Brasil descrevendo sua paisagem e o povo que a habitava, bem como as mazelas que o afligiam. A mais conhecida delas é comemorada aqui, quando Carlos Chagas foi enviado por Oswaldo Cruz para controlar a malária nos operários da estrada de ferro na região de Lassance, no estado de Minas Gerais. Foi aí que se deu a descoberta da doença que tomou seu nome. Entretanto, outras foram concomitantes a ela, menos conhecidas mas tão espetaculares quanto. Entre elas destaca-se a de Belisário Pena e Arthur Neiva ao nordeste do Brasil (Neiva & Pena, 1916). Os dois pesquisadores lideraram uma expedição em 1912, partindo do Rio de Janeiro a Salvador por navio, daí seguindo por terra, em caminhões, até Petrolina, em Pernambuco. De lá, seguiram em lombo de burro até São Raimundo Nonato, sudeste do estado do Piauí, depois para Goiás. O relato é primoroso. Dele partiu nossa hipótese sobre nova história da doença de Chagas na América do Sul, pois descrevem diversas espécies de triatomíneos em abrigos rochosos e ninhos de pássaros.

Em 1984 visitamos, a convite de Niéde Guidon, a escavação do sítio arqueológico da Toca do Boqueirão do Sítio da Pedra Furada, local que se tornaria o conhecido Parque Nacional Serra da Capivara, no estado do Piauí. Niéde havia reunido notável número de pesquisadores e estudantes interessados na escavação, cerca de cinqüenta pessoas, mormente levando-se em conta as precárias condições para abrigar visitantes, existentes na então pequena cidade de São Raimundo Nonato e seus arredores. De lá seguimos na carroceria de caminhão, com víveres e principalmente água, pois fazia cinco anos que não chovia, para o sítio arqueológico que se tornaria um dos mais polêmicos das Américas, por suas datações para ocupação humana nas Américas extraordinariamente antigas (Guidon & Delibrias, 1986; Guidon, 1989; Guidon & Arnaud, 1991).

As escavações no sítio arqueológico aconteciam durante todo o dia. Ao mesmo tempo que a maioria dos arqueólogos trabalhava o solo, outros copiavam, por cima de folhas de plástico, as pinturas feitas pelos antigos artistas da pré-história. Estes eram atacados constantemente por triatomíneos, identificados e examinados no Instituto Oswaldo Cruz. Tratava-se da espécie *Triatoma brasiliensis*, e alguns estavam infectados por *T. cruzi*.

Tanto no início da manhã, nas horas mais quentes do dia, quanto à noite, surgiam ninfas e adultos de *T. brasiliensis* tentando alimentar-se do sangue dos arqueólogos, estudantes e trabalhadores das escavações. Por isso, levantamos a possibilidade de que os antigos artistas e moradores do grande abrigo-sob-rocha fossem também picados pelos triatomíneos e contaminados pelo parasito (Araújo *et al.*, 2003). Mas havia poucos vestígios orgânicos preservados no sítio arqueológico e ainda não se contava, à época, com as técnicas de biologia molecular capazes de recuperar material genético de *T. cruzi*.

ORIGEM DA INFECÇÃO EM HUMANOS: A TEORIA CLÁSSICA

Segundo a teoria aceita sobre a origem da doença de Chagas em humanos, há cerca de 8.000 – 6.000 anos os povos andinos deram início à domesticação de pequenos roedores (*Cavia sp.*) para alimentação e rituais. Ela aparece em diversas publicações importantes, como no excelente livro publicado por João Carlos Pinto Dias e José Rodrigues Coura (1997). Os animais eram mantidos dentro das casas e teriam atraído insetos hematófagos, vetores de *T. cruzi* (Rothhammer *et al.*, 1985). Também o início da estocagem de grãos e a conseqüente atração de pequenos animais, especialmente roedores, tiveram papel importante nesse processo. Os triatomíneos vetores de *T. cruzi*, notadamente da espécie *Triatoma infestans*, encontraram nas habitações humanas, construídas com madeira e barro socado, ótimas condições para colonização e obtenção de alimento, quer sangue humano quer dos animais domésticos.

É provável que a espécie *T. infestans* tenha se tornado domiciliada entre os povos andinos nessa época, dispersando-se em grande parte com ajuda de migrações humanas por outras áreas da América do Sul, inclusive para o outro lado da cordilheira dos Andes, após a chegada de europeus e africanos ao continente, com a difusão de construções dos precários domicílios denominados "casas de pau-a-pique". Neles o vetor encontrou condições ótimas de colonização por entre as frestas e reentrâncias nas paredes, típicas deste tipo de moradia. Portanto, a doença de Chagas teria sido originária da região dos Andes, nas populações pré-históricas de 8.000 – 6.000 anos antes do presente (AP), atingindo outras regiões das Américas a partir do período colonial europeu. Pensava-se que, nas terras brasileiras, a infecção por *T. cruzi* não teria sido um problema para as populações indígenas, uma vez que elas eram, em sua grande maioria, nômades e usavam habitações em que os triatomíneos não se adaptam bem (Coimbra Jr., 1988; Dias & Coura, 1997).

Os dados da paleoparasitologia mostraram uma situação contrária e mudaram a teoria classicamente aceita. Cem anos após sua descoberta, uma outra história da doença de Chagas começa a ser escrita. O cenário que se desenha sustenta a hipótese de que provavelmente a doença de Chagas é tão antiga quanto a presença humana nas Américas.

A DOENÇA DE CHAGAS EM POPULAÇÕES SUL-AMERICANAS PRÉ-HISTÓRICAS

Um dos primeiros artigos a tratar de doença de Chagas em múmias sul-americanas foi o de Rothhammer e colaboradores (1985), em que se descrevem lesões cardíacas compatíveis com o quadro clínico crônico da doença. As evidências são obtidas em 35 corpos mumificados do deserto de Atacama, norte do Chile, datados de 470 a. C. e 600 d. C., mas baseiam-se também em notícias de cronistas e na adaptação de *T. infestans* ao domicílio em épocas passadas. Uma múmia inca peruana foi necropsiada por Fornaciari e colaboradores (1992), mostrando evidências da doença de Chagas nas lesões descritas, inclusive a presença de ninhos de amastigotas na musculatura cardíaca.

Guhl e colaboradores (1997, 1999) iniciam os estudos moleculares em múmias do deserto de Atacama. Conseguem isolar o DNA de *T. cruzi* de tecidos mumificados datados de até 4.000 anos. Ferreira e colaboradores (2000) publicam artigo sobre múmias chilenas, estas também do deserto de Atacama, mas da região da atual cidade de San Pedro de Atacama, oásis no deserto e centro de intenso comércio no passado. Este achado, iniciado com as pesquisas de Bastos e colaboradores (1996), confirma a extensão da infecção chagásica em períodos

de até 2.000 anos. Estes artigos resultaram nas propostas de Guhl e colaboradores (2000) sobre migrações humanas pré-históricas e doença de Chagas. As técnicas usadas até então são comentadas por Madden e colaboradores (2001) e, por fim, Aufderheide e colaboradores (2004) publicam isolamento de DNA de *T. cruzi* em múmias Chinchorro datadas de 9.000 anos, conseqüentemente alguns milhares de anos antes da época conhecida para domesticação de roedores e camelídeos, nos Andes (Rothhammer *et al.*, 1985).

Portanto, a doença de Chagas estava presente nas populações pré-colombianas do Chile e Peru. Provavelmente no continente americano os grupos humanos pré-históricos entraram em contato com o parasito em diversas ocasiões, dependendo do modo como atuavam e interagiam com o ambiente. Até o presente, o manejo do ambiente é um fator de risco importante (Emperaire & Romana, 2006; Xavier *et al.*, 2007).

A TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI* EM POPULAÇÕES PRÉ-HISTÓRICAS NAS TERRAS BRASILEIRAS: A QUEBRA DO PARADIGMA SOBRE A ORIGEM NAS REGIÕES ANDINAS

Embora ainda não se tenha comprovado a infecção chagásica nas populações pré-históricas do Parque Nacional Serra da Capivara, sudeste do Piauí, nordeste do Brasil, a infecção por *T. cruzi* e lesões compatíveis com doença de Chagas foram descritas em grupos nômades e semi-sedentários em sítios arqueológicos de Minas Gerais no Brasil e nos Estados Unidos.

Os primeiros testes foram realizados na Fundação Oswaldo Cruz, antes de aplicá-los no material arqueológico. Protocolos tentativos foram feitos em camundongos infectados com carga parasitária conhecida. Após sacrifício dos animais, os órgãos eram colocados em estufa em temperatura de 40°C até sua completa dessecação. Depois desta 'mumificação' experimental, aplicaram-se as técnicas de biologia molecular até atingir um padrão a ser usado no material arqueológico (Bastos *et al.*, 1996).

Partimos da hipótese de que a doença de Chagas é tão antiga em humanos como a presença destes no continente americano, sempre que houvesse condições para sua transmissão, isto é, ambiente propício, presença do parasito circulando em vetores e animais em convivência com humanos. A doença de Chagas, portanto, dataria de milhares de anos, muito antes dos pequenos roedores serem domesticados na região andina. Para isso, testaram-se vestígios orgânicos humanos de diversos sítios arqueológicos norte e sul-americanos, como ossos e outros tecidos mumificados. As amostras foram estudadas no Instituto Oswaldo Cruz, primeiramente no Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos – quando a pesquisadora visitante Katharina Dittmar, atualmente na State University of New York at Buffalo, esteve no Laboratório de Paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca –, logo depois no Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos – com as pesquisas coordenadas por Ana Carolina Paulo Vicente e Alena Iniguez, e a participação dos estudantes Valdirene Lima e Alexandre Fernandes. Ossos de animais e outros vestígios também foram pesquisados, assim como buscou-se identificar fragmentos de artrópodes vetores de *T. cruzi* nas camadas arqueológicas. Curiosamente, os coprólitos humanos também precisam ser cuidadosamente examinados, pois há evidências de que havia consumo de artrópodos diversos, acidental ou intencionalmente, pelos grupos pré-históricos nas Américas (Reinhard *et al.*, 1992, 2003; Johnson *et al.*, 2008).

Os resultados da extração e amplificação do DNA antigo de *T. cruzi* podem elucidar alguns aspectos sobre as linhagens conhecidas do parasito circulando hoje nas Américas

(Stevens & Gibson, 1999; Stevens *et al.*, 2001). Por exemplo, foram encontradas diferenças no quadro clínico entre pessoas infectadas pelo parasito no nordeste brasileiro atual, exatamente na região do Parque Nacional Serra da Capivara (Borges-Pereira *et al.*, 2002), que podem ser explicadas por processos adaptativos ao longo do tempo. Com a paleoparasitologia, é possível traçar a origem e a evolução das doenças infecciosas e, assim, entender melhor sua emergência e dispersão (Cockburn, 1967).

Na região do cerrado do norte do estado de Minas Gerais, no Vale do Peruaçu, Brasil central, escavada por André Prous, encontrou-se um corpo parcialmente mumificado de um indivíduo de cerca de 35 a 40 anos, que estava enterrado em uma cova oval, no interior de um abrigo-sob-rocha, próximo ao rio Peruaçu (Kipnis, 2008). Num primeiro exame de fragmentos de coprólitos retirados dessa múmia, encontraram-se ovos de *Echinostoma sp.*, um parasito que não é comum no hospedeiro humano, e ovos de ancilostomídeos (Sianto *et al.*, 2005).

Nessa parte do Brasil central a preservação de restos orgânicos é muito boa. Embora haja matas de galeria ao longo dos rios, a vegetação é característica do cerrado. O corpo estava colocado em posição fetal, protegido por folhas e coberto por cestos; a cabeça também estava envolta em folhas. O corpo encontra-se parcialmente mumificado, braços, pernas, pele abdominal e musculatura de algumas partes estão bem preservados. Muitos objetos pessoais foram encontrados na cova. Apesar de fraturas solidificadas terem sido identificadas nos ossos do pé, não há sinais de violência no esqueleto. Destacam-se lesões orais, como desgaste dentário, cáries e abscesso dentário. Uma grande massa na cavidade abdominal foi diagnosticada como acúmulo de fezes, a obstruir o cólon descendente e sigmóide. A forma da massa fecal reproduz as circunvoluções do intestino. Fez-se cuidadosa limpeza e a massa foi exposta, mas antes submeteu-se o corpo à tomografia computadorizada, obtendo-se imagens detalhadas do interior da múmia (Fernandes *et al.*, 2008). Para confirmar a suspeita de se tratar de um caso de megacólon chagásico, testou-se por PCR a presença de *T. cruzi* com resultados positivos. Mais ainda, foi possível confirmar a presença do parasito em vários tecidos do indivíduo com alta carga parasitária. O resultado positivo para PCR em tecido contíguo à massa fecal confirma a patologia encontrada como megacólon chagásico.

Em estudo de outro indivíduo de sítio arqueológico próximo, Lima *et al.* (2008) diagnosticaram a infecção por *T. cruzi* em fragmentos de ossos humanos datados de 7.000 a 4.500 AP. Os fragmentos eram de um indivíduo do sexo feminino, morto com aproximadamente 35-39 anos, pertencente a uma população de caçadores-coletores. A genotipagem foi obtida através da amplificação e seqüenciamento de um fragmento do gene de miniexon (339 bp). A hibridação com iniciadores específicos deste fragmento de DNA (seqüências de mini-exon TcI e TcII e k-DNA total) confirmaram a presença de *T. cruzi* no material em questão. A presença do genótipo TCI em um tecido ósseo humano, datado de 7.000 – 4.500 anos AP em Minas Gerais, uma região onde este genótipo não é registrado infectando o hospedeiro humano (Fernandes *et al.*, 1999), mostra que a distribuição dos genótipos de *T. cruzi* é dinâmica e varia nos diferentes recortes temporais e espaciais. A possibilidade de genotipar o parasito encontrado em remanescentes arqueológicos abre a fascinante possibilidade de reconstruir a origem e a dispersão de *T. cruzi* e de suas subpopulações e, quem sabe, resolver a questão referente ao hospedeiro ancestral do parasito.

Para completar o quadro da paleoepidemiologia da doença de Chagas fora da região andina em tempos pré-históricos, há ainda o caso descrito na fronteira entre Estados Unidos e México, com datação de 1.150 AP, em que Reinhard, Fink e Skiles (2003) descreveram enorme massa fecal no indivíduo, em um caso de megacólon chagásico comprovado por técnicas de biologia molecular (Dittmar *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2005).

CONCLUSÕES

Muitos vestígios importantes no genoma de parasitos e hospedeiros permanecem durante o processo coevolutivo do sistema parasito-hospedeiro-ambiente (Araújo *et al.*, 2003). Estes remanescentes são transmitidos pelo genoma e podem revelar importantes eventos do processo evolutivo. A paleoparasitologia, especialmente pelo uso das técnicas de biologia molecular, oferece novas formas de estudar as relações parasito-hospedeiro, uma vez que é possível recuperar o genoma antigo tanto de parasitos como hospedeiros (Araújo & Ferreira, 2000; Araújo *et al.*, 2003).

Os estudos sobre a paleoparasitologia da doença de Chagas[1] podem esclarecer a antiguidade desta doença nas Américas pela extração e amplificação de DNA de *T. cruzi* em vestígios orgânicos humanos e de outros animais, incluindo-se fragmentos de vetores e hospedeiros vertebrados encontrados em sítios arqueológicos. É possivel comparar o material extraído em diferentes períodos de ocupação humana, como no período de caçadores-coletores e agricultores, moradores de grutas ou abrigo-sob-rocha e grupos que viviam em aldeias. Um quadro paleoepidemiológico começa a ser traçado, com interessantes possibilidades sobre a emergência da doença nos habitantes, ou ocupantes ocasionais, das grutas e paredões rochosos, enquanto parece diminuir ou desaparecer por completo nos grupos que viviam em aldeias e mudavam eventualmente o local de ocupação.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. & FERREIRA, L. F. Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationship. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, supl. 1: 89-93, 2000.

ARAÚJO, A.; REINHARD, K. & FERREIRA, L. F. Parasite findings in archaeological remains: diagnosis and interpretation. *Quaternary International*, 174: 1-4, 2008.

ARAÚJO, A. *et al.* Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, supl. 1: 5-11, 2003.

ARAÚJO, A. *et al.* Paleoparasitology of Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38: 490-490, 2005.

ARAÚJO, A. *et al.* Parasites as probes for prehistoric migrations? *Trends in Parasitology*, 24: 112-115, 2008.

AUFDERHEIDE, A. C. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101: 2.034-2.039, 2004.

BASTOS, O. M. *et al.* Experimental paleoparasitology: identification of *T. cruzi* DNA in desiccated mouse tissue. *Paleopathology Newsletter*, 94: 5-8, 1996.

BORGES-PEREIRA, J. *et al.* Estudo da infecção e morbidade da doença de Chagas no município de João Costa, Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35: 315-322, 2002.

COCKBURN, A. *Infectious Diseases: their evolution and eradication*. Cambridge: Cambridge University Press, 1967.

[1] Esses estudos contaram com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) e Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (Papes/Fiocruz).

COIMBRA JR., C. E. A. Human settlements, demographic pattern, and epidemiology in lowland Amazonia: the case of Chagas' disease. *American Anthropologist*, 90: 82-97, 1988.

DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. Epidemiologia. *In*: DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. (Orgs.) *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

DITTMAR, K. *et al*. Molecular diagnosis of prehistoric *Trypanosoma cruzi* in the Texas-Coahuila border region. *In*: ANUAL MEETING OF THE PALEOPATHOLOGY ASSOCIATION, 13th, 2003, Tempe, Arizona. Supplement of the Paleopathology Newsletter. Detroit: Paleopathology Association, 2003.

EMPERAIRE, L. & ROMAÑA, C. A. *Triatominae* et *Cactaceae*: un risque pour la transmission de la trypanosomose americaine dans le peridomicile (nord-est du Brésil). *Parasite*, 13: 171-178, 2006.

FERNANDES, A. *et al*. Pre-Columbian Chagas' disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 514-516, 2008.

FERNANDES, O. *et al*. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*, 118: 161-166, 1999.

FERREIRA, L. F. *et al*. Paleoparasitology of Chagas' disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Tropica*, 75: 79-84, 2000.

FORNACIARI, G. *et al*. Chagas' disease in a Peruvian Inca mummy. *The Lancet*, 339: 128-129, 1992.

GUHL, F. *et al*. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. *The Lancet*, 349: 1.370, 1997.

GUHL, F. *et al*. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4.000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *American Journal of Physical Anthropology*, 108: 401-407, 1999.

GUHL, F. *et al*. Chagas' disease and human migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 553-555, 2000.

GUIDON, N. On stratigraphy and chronology of Pedra Furada. *Current Anthropology*, 30: 641-642, 1989.

GUIDON, N. & ARNAUD, B. The chronology of the New World: two faces of one reality. *World Archaeology*, 23: 524-529, 1991.

GUIDON, N. & DELIBRIAS, G. Carbon 14 dates point to man in the Americas 32,000 years ago. *Nature*, 324: 167-178, 1986.

JOHNSON, K. L. *et al*. A tick from a prehistoric Arizona coprolite. *Journal of Parasitology*, 94: 296-298, 2008.

KIPNIS, R. Padrões de subsistência dos povos forrageiros do Vale do Peruaçu. *In*: PROUS, A. P. & RODET, J. (Orgs.) *Arqueologia do Vale do Peruaçu*. Belo Horizonte: Museu de História Natural/UFMG, 2008.

LIMA, V. S. *et al*. Chagas' disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. *Infection Diseases*, 14: 1.001-1.002, 2008.

MADDEN, M. *et al*. Hybridization screening of very short PCR products for paleoepidemiological studies of Chagas' disease. *Biotechniques*, 30: 102-104, 2001.

NEIVA, A. & PENA, B. Viagem científica pelo norte da Bahia, sudoeste de Pernambuco, sul do Piauí e de norte a sul de Goiás. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 8: 74-224, 1916.

REINHARD, K.; FINK, M. & SKILES, J. A case of megacolon in Rio Grande Valley as a possible case of Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, supl. 1: 165-172, 2003.

REINHARD, K. J. *et al*. Discovery of colon contents in a skeletonized burial: soil sampling for dietary remains. *Journal of Archaeological Science*, 19: 697-705, 1992.

ROTHHAMMER, F. *et al*. Chagas' disease in pre-Columbian South America. *American Journal of Physical Anthropology*, 68: 495-498, 1985.

SIANTO, L. *et al*. The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a Brazilian mummified body dated 600-1,200 years before present. *Journal of Parasitology*, 91: 972-975, 2005.

STEVENS, J. R. *et al*. The molecular evolution of *Trypanosomatidae*. *Advances in Parasitology*, 48: 1-56, 2001.

STEVENS, J. R. & GIBSON, W. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cadernos de Saúde Pública*, 15: 673-684, 1999.

XAVIER, S. C. *et al*. Mapping of the distribution of *Trypanosoma cruzi* infection among small wild mammals in a conservation unit and its surroundings (Northeast-Brazil). *Parasitology International*, 56: 119-128, 2007.

Construindo a Doença e a Nação: a história da descoberta da doença de Chagas

Simone Petraglia Kropf
Nara Azevedo
Programa de Pós-Graduação em História das Ciências e da Saúde
Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz

De acordo com estimativas recentes, a doença de Chagas atinge entre 12 e 14 milhões de pessoas em 18 países endêmicos na América Latina. No Brasil, em função das migrações internas das últimas décadas, a maioria (cerca de 70%) dos infectados vive nas cidades, sobretudo do Sudeste. Há medicamentos específicos para o tratamento, mas eles causam efeitos colaterais e, em geral, não são eficazes para a fase crônica da doença (Dias, 2007; Dias, Prata & Correia, 2008; Fiocruz, 2007).

Em 2006, o Brasil recebeu da Organização Mundial da Saúde (OMS) o certificado de interrupção da transmissão pela principal espécie de vetor, o *Triatoma infestans*. Apesar disso, em várias regiões, há espécies de triatomíneos silvestres que podem vir a domiciliar-se, criando novos focos de transmissão da doença. Os especialistas chamam a atenção para a necessidade de manter a vigilância epidemiológica e as ações de controle e enfatizam, em particular, a importância dos aspectos socioambientais, uma vez que o convívio do vetor com os seres humanos está relacionado ao desmatamento e à precariedade das condições habitacionais.

A doença de Chagas permanece, portanto, como relevante problema de saúde pública, tal como alertou Carlos Chagas desde o início de suas investigações em 1909. Ao afirmar que a 'nova entidade mórbida' identificada no sertão mineiro, intimamente relacionada à pobreza e às más condições de vida das populações rurais, era um grave obstáculo à modernização do país, o jovem cientista provocou perplexidade entre vários segmentos sociais da capital federal, recém-reformada como vitrine do 'progresso' da República brasileira, proclamada vinte anos antes. Muitos aderiram à sua denúncia sobre os 'males' deste Brasil desconhecido do interior, mas outros iriam reagir a ela intensamente. A Academia Nacional de Medicina,

que em 1910 o recebera como membro titular, representante de uma das maiores 'glórias' da ciência nacional, seria palco de intensa controvérsia na década de 1920. Alguns médicos questionaram os trabalhos de Chagas e o acusaram de 'antipatriota' e 'pessimista', por considerarem que o diagnóstico de um 'país doente', assolado por endemias, era 'exagerado' e prejudicava a imagem do país no exterior. Ciência e política iriam marcar, de modo decisivo, a trajetória desta enfermidade, cuja descoberta completa o primeiro centenário.

A DOENÇA DE CHAGAS COMO NOVO OBJETO CIENTÍFICO

Carlos Ribeiro Justiniano Chagas nasceu em julho de 1878, em uma fazenda de café próxima a pequena cidade de Oliveira (MG), e veio para a então capital federal em 1897, para estudar na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, onde se formou em 1903. Sua tese de doutorado, sobre malária, foi desenvolvida no Instituto de Manguinhos sob orientação de Oswaldo Cruz (1872-1917).[1] Vivia-se na época grande efervescência em torno das teorias de Louis Pasteur (1822-1895) e Robert Koch (1843-1910) sobre a ação de microrganismos como causas específicas de doenças e sobre a produção de soros e vacinas para combatê-las. No campo da chamada 'medicina dos climas quentes', comemoravam-se as descobertas acerca do papel dos insetos na transmissão de temidas enfermidades, como a malária e a febre amarela. A preocupação dos europeus em enfrentar as doenças em suas colônias levou à criação, em 1899, na Inglaterra, das primeiras escolas dedicadas ao estudo e ensino da medicina tropical (Arnold, 1996; Worboys, 1997). Esses conhecimentos e práticas marcaram de modo decisivo a trajetória profissional de Chagas, consagrada por contribuição inovadora aos estudos sobre as doenças parasitárias transmitidas por insetos-vetores.

Logo depois de formado, o jovem médico foi designado por Oswaldo Cruz para combater epidemias de malária que prejudicavam importantes obras de modernização em Itatinga (SP), onde a Companhia Docas de Santos construía uma hidrelétrica para abastecer aquele porto, e em Xerém (RJ), onde a Inspetoria de Obras Públicas realizava a captação de água para a capital. Em junho de 1907, partiu em outra missão contra a doença, junto aos operários que trabalhavam na extensão da Estrada de Ferro Central do Brasil no norte de Minas Gerais, entre Corinto e Pirapora. Essa ferrovia era um importante meio de integração e povoamento do território nacional, bem como de escoamento da produção agrícola brasileira.[2] Foi no decorrer desta campanha que Chagas realizou sua 'tripla' descoberta: identificou uma nova doença humana, seu agente causal e o inseto que o transmitia.

No povoado de São Gonçalo das Tabocas – que passou a chamar-se Lassance com a inauguração da estação ferroviária, em 1908, em homenagem ao engenheiro da Central do Brasil Ernesto Lassance Cunha –, Chagas instalou um pequeno laboratório num vagão de trem, que também usava como dormitório. Enquanto coordenava as ações contra a malária, observava espécies da fauna brasileira, motivado por seu interesse pela entomologia e pela protozoologia. Em 1908, ao examinar o sangue de um sagüi, identificou um protozoário do gênero *Trypanosoma*, que denominou de *Trypanosoma minasense* (Chagas, 1908). A nova espécie era um parasito não patogênico do macaco.

[1] Sobre Carlos Chagas, ver Chagas Filho (1993), Kropf & Hochman (2007). O arquivo pessoal de Carlos Chagas encontra-se sob a guarda do Departamento de Arquivo e Documentação da Casa de Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (COC/Fiocruz).

[2] Sobre as campanhas de Chagas contra a malária no contexto da modernização republicana no início do século XX, ver Benchimol & Silva (2008).

Naquele período, o estudo dos tripanossomas atraía a atenção de pesquisadores europeus, sobretudo desde que se comprovara que, além de doenças animais, eles causavam enfermidades humanas, como a doença do sono ou tripanossomíase africana. Além do interesse por novos parasitos, Chagas tinha a atenção dirigida a insetos que pudessem atuar como vetores. Em uma viagem a Pirapora, o médico Belisário Penna (1868-1939), que o acompanhava na campanha contra a malária, capturou exemplares de um inseto sugador de sangue comum na região, sobre o qual lhes havia falado Cornélio Cantarino Mota (1869-1959), chefe dos engenheiros da estrada de ferro. Era chamado popularmente de 'barbeiro', pelo fato de picar suas vítimas preferencialmente no rosto. O inseto proliferava nas choupanas de pau-a-pique, escondendo-se nas frestas das paredes de barro durante o dia e atacando os moradores à noite.

Ciente do papel dos insetos hematófagos na transmissão de doenças, Chagas examinou alguns barbeiros e encontrou, em seus intestinos, um protozoário. Ao observar suas características, cogitou que poderia ser um parasito natural do inseto ou então um tripanossoma de vertebrados. Uma hipótese, nesse caso, seria tratar-se de estágio evolutivo do próprio *T. minasense* que acabara de identificar nos macacos da região. Por não dispor em Lassance de condições laboratoriais para prosseguir na pesquisa, enviou alguns barbeiros a Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro. Depois de colocar os insetos em contato com macacos criados em laboratório, portanto, livres de qualquer infecção, Cruz percebeu que alguns animais haviam adoecido e apresentavam parasitos no sangue. De volta a Manguinhos, Chagas concluiu que o protozoário em questão não era o *minasense*, mas uma nova espécie de tripanossoma, que batizou de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao 'mestre'. A nota anunciando a descoberta foi redigida em 17 de dezembro de 1908 e publicada na revista do Instituto de Doenças Marítimas e Tropicais de Hamburgo, no início de 1909 (Chagas, 1909a).

No Instituto Oswaldo Cruz, Chagas iniciou estudos sistemáticos sobre as características biológicas e o ciclo evolutivo do novo parasito. O barbeiro passou a ser minuciosamente investigado por Arthur Neiva, também pesquisador do instituto. Em busca de outros hospedeiros vertebrados do *T. cruzi* e suspeitando que o homem pudesse ser um deles – hipótese reforçada por seus conhecimentos sobre a malária, também transmitida por um inseto hematófago domiciliário e causada por um hematozoário –, Chagas retornou a Lassance. Ali examinou o sangue de animais domésticos e de moradores. Depois de verificar a presença do parasito em um gato, finalmente identificou, no dia 14 de abril de 1909, a presença do *T. cruzi* no sangue de uma criança febril, de dois anos, chamada Berenice. Em nota publicada no *Brasil Médico*, uma das principais revistas médicas do país, anunciou o primeiro caso do que seria considerada, a partir de então, uma nova tripanossomíase humana:

> Num doente febricitante, profundamente anemiado e com edemas, com plêiades ganglionares engurgitadas, encontramos tripanossomas, cuja morfologia é idêntica à do *Trypanosoma cruzi*. Na ausência de qualquer outra etiologia para os sintomas mórbidos observados e ainda de acordo com a experimentação anterior em animais, julgamos tratar-se de uma tripanossomíase humana, moléstia ocasionada pelo *Trypanosoma cruzi*, cujo transmissor é o *Conorrhinus sanguissuga* (?).[3] (Chagas, 1909c: 161)

No mesmo dia em que essa revista publicava o trabalho de Chagas, outro texto seu foi lido por Oswaldo Cruz na Academia Nacional de Medicina (Chagas, 1909e). O fato foi anunciado também em artigos que Chagas publicou em importantes revistas estrangeiras, na Alemanha (Chagas, 1909f) e na França (Chagas, 1909b).

[3] Interrogação do autor relativa à dúvida acerca da espécie da qual fazia parte o barbeiro. Logo depois, o inseto foi identificado como sendo da espécie *Conorrhinus megistus* (posteriormente denominada *Panstrongylus megistus*).

A descoberta e os primeiros estudos da doença tiveram impacto imediato na carreira científica de Chagas. Em 1910, alcançou o primeiro lugar em concurso realizado no Instituto Oswaldo Cruz para preencher a vaga de 'chefe de serviço', importante cargo na instituição. Em 26 de outubro desse mesmo ano, foi admitido como membro titular da Academia Nacional de Medicina, em caráter excepcional, uma vez que não havia vaga disponível. No ano seguinte, na Exposição Internacional de Higiene e Demografia, realizada em Dresden, Alemanha, o pavilhão brasileiro deu destaque à nova doença, projetando o nome de Chagas no cenário científico internacional, o que lhe renderia, em 1912, a conquista do Prêmio Schaudinn de protozoologia, pelo Instituto de Doenças Marítimas e Tropicais de Hamburgo. Em 1913, receberia sua primeira indicação ao Prêmio Nobel de Medicina.

A repercussão científica da descoberta de Carlos Chagas trouxe também valiosos dividendos científicos e políticos para o Instituto Oswaldo Cruz, ao qual foram concedidas verbas federais para equipar um pequeno hospital em Lassance (onde seriam desenvolvidos estudos clínicos sobre a doença), bem como para erguer em Manguinhos um hospital destinado às pesquisas e ao acompanhamento dos doentes identificados no norte de Minas Gerais e em outras regiões do país (origem do atual Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Ipec). A nova tripanossomíase assumiu centralidade na agenda de investigações de Manguinhos, mobilizando o trabalho de vários pesquisadores, como Gaspar Vianna, Arthur Neiva, Astrogildo Machado, Ezequiel Dias, Eurico Villela, Carlos Bastos de Magarinos Torres.

Sob a liderança de Chagas, a doença passou a ser estudada em seus diferentes aspectos, como as características biológicas do vetor e do parasito, o ciclo evolutivo do *T. cruzi*, o quadro clínico e a patogenia da infecção, as características epidemiológicas, os mecanismos de transmissão e as técnicas de diagnóstico. A prioridade conferida ao tema em Manguinhos e a visibilidade pública alcançada por Chagas, que divulgava seus estudos nas principais associações médicas do país, pavimentaram o caminho que o levaria ao cargo de diretor do instituto após a morte de Oswaldo Cruz, em fevereiro de 1917, posição que ocuparia até o final da vida, em 1934.

CIÊNCIA, POLÍTICA E SOCIEDADE

Para os contemporâneos de Carlos Chagas e os memorialistas que se dedicaram a narrar a descoberta da doença que leva seu nome, esta representou um 'feito único' na história da medicina. Em primeiro lugar, pelo caráter incomum da seqüência sob a qual ocorreu: foram inicialmente identificados o transmissor e o agente causal para, em seguida, determinar-se a doença a eles associada. E, principalmente, pelo fato de o mesmo pesquisador haver descoberto, em curto intervalo de tempo, um novo vetor, um novo parasito e uma nova doença, além de ter dedicado toda a vida a estudá-la em seus múltiplos aspectos (ver, entre outros, Almeida, 1938; Magalhães, 1944; Rezende, 1959; Brener, 1989; Coura, 1997; Morel, 1999; Chagas Filho, 1993).

Os historiadores que abordaram o tema da descoberta ressaltam sua inserção no contexto de afirmação e institucionalização da medicina tropical européia, em função tanto dos referenciais teóricos que a viabilizaram, quanto da contribuição que ela significou para consolidar a nova especialidade criada na Inglaterra por Patrick Manson nos últimos anos do século XIX (Stepan, 1976, 2001; Benchimol & Teixeira, 1993; Perleth, 1997; Worboys, 1997; Coutinho, 1999, 2003; Delaporte, 2003; Sá, 2005; Kropf, 2009).

Sá (2005) aponta a importância do estudo do *T. cruzi* para a compreensão de complexas questões relativas à relação parasito-hospedeiro no caso das infecções causadas por tripanossomas.[4] Outro aspecto salientado é a importância da descoberta como fonte de legitimação, visibilidade e recursos para o Instituto Oswaldo Cruz. Stepan (1976) e Benchimol e Teixeira (1993) enfatizam que o episódio contribuiu fortemente para a consolidação da protozoologia, como área de concentração das pesquisas na instituição, e impulsionou seu reconhecimento na comunidade científica internacional, como centro de investigação sobre doenças tropicais.

A descoberta da doença de Chagas foi também um fator decisivo para o debate político sobre a importância do saneamento rural do Brasil e a necessidade de reorganização dos serviços federais de saúde, que culminaria na criação do Departamento Nacional de Saúde Pública em 1920, do qual Chagas foi o primeiro diretor (1920-1926). De acordo com Kropf (2009), a doença de Chagas foi definida, desde o início, não apenas como fato médico-científico, mas também como fato social, problema de saúde pública. Configurou-se, assim, como 'doença do Brasil': o emblema de um país assolado pelas endemias rurais e da ciência que identificava tais problemas e propunha as medidas para enfrentá-los.

Além de produzir, no laboratório, os conhecimentos sobre a nova doença, Chagas lançou-se em intensa mobilização para convencer a sociedade de que a tripanossomíase americana afetava amplas regiões do Brasil e, por prejudicar o desenvolvimento físico e mental das populações do interior (sobretudo crianças e jovens), comprometia seriamente a construção de uma nação 'civilizada' (Chagas, 1910). No contexto do forte debate nacionalista durante a Primeira Guerra, esta idéia tornou-se uma das principais 'bandeiras' do movimento sanitarista (1916-1920).[5] Mobilizando intelectuais, políticos, médicos e cientistas, entre eles Carlos Chagas e vários pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz, o movimento preconizava que o 'atraso' do país se devia não ao clima tropical ou à sua composição racial, mas às endemias rurais e à falta de atenção e de medidas por parte do Estado voltadas para as populações do interior. A campanha pelo saneamento dos 'sertões' conferiu grande projeção à doença de Chagas como símbolo do 'Brasil imenso hospital', célebre expressão cunhada em 1916 pelo médico Miguel Pereira (1871-1918) para denunciar a 'calamidade sanitária' do interior do país (Kropf, 2009).

Ao associar, de modo tão estreito, ciência, saúde e debate político sobre a nação, a descoberta e as pesquisas de Carlos Chagas significaram a 'tradução' da medicina tropical européia às questões e desafios específicos da realidade brasileira. Segundo Chagas (que em 1925 assumiu a então criada cátedra de medicina tropical da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro), o estudo das doenças tropicais no Brasil era fundamental não apenas do ponto de vista dos novos conhecimentos científicos produzidos internacionalmente no âmbito desta especialidade, mas, principalmente, porque "representam tais doenças o mais relevante de nossos problemas médico-sociais" (Chagas, 1935f: 138).

Apesar do 'marco' de 1909, é importante considerarmos que a doença de Chagas tornou-se um fato científico validado e um problema de saúde pública socialmente reconhecido por meio de um processo longo e coletivo, que envolveu não apenas cientistas, mas outros grupos

[4] Ver, em especial, o trabalho de Chagas (1909d) publicado no primeiro volume das *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

[5] Sobre o movimento sanitarista e a reforma dos serviços de saúde pública, ver: Castro-Santos (1985, 1987), Labra (1985), Britto (1995), Lima & Britto (1996), Lima & Hochman (1996, 2004), Hochman (1998) e Lima (1999).

e esferas da vida social (Kropf, 2005, 2009; Kropf, Azevedo & Ferreira, 2003).[6] A partir da década de 1950, passou a integrar a pauta das campanhas do Ministério da Saúde[7] e tornou-se tema de pesquisa nas universidades e outros espaços institucionais. Garantia-se, assim, a continuidade da tradição de pesquisa criada em Manguinhos por Oswaldo Cruz e Carlos Chagas, destinada a associar excelência científica e compromisso social com a saúde da população brasileira.

Cem anos depois, a mobilização quanto à importância médico-social desta enfermidade ganha novos sentidos, em novos contextos e com novos desafios, na agenda sanitária e política em torno das chamadas 'doenças tropicais negligenciadas' e de sua relação com a pobreza nos países em desenvolvimento. Assim como no tempo de Carlos Chagas, é fundamental compreendermos a produção dos conhecimentos e os debates e ações públicas sobre a doença de Chagas, levando-se em consideração as características da sociedade em que estes se inserem. A história, neste sentido, permite não apenas conhecer o passado, mas refletir sobre perspectivas e ações no presente e no futuro.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. O. de. *Ensaios, Críticas e Perfis*. Rio de Janeiro: F. Briguiet & Cia., 1938.

ARNOLD, D. (Ed.) *Warm Climates and Western Medicine: the emergence of Tropical Medicine, 1500-1900*. Amsterdam, Atlanta: Rodopi, 1996.

BENCHIMOL, J. L. & SILVA, A. F. C. da. Ferrovias, doenças e medicina tropical no Brasil da Primeira República. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, 15: 719-62, 2008.

BENCHIMOL, J. L. & TEIXEIRA, L. A. *Cobras, Lagartos & Outros Bichos: uma história comparada dos institutos Oswaldo Cruz e Butantan*. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1993.

BRENER, Z. A descoberta: homenagem aos 80 anos da descoberta da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84, supl. II: 1-6, 1989.

BRITTO, N. *Oswaldo Cruz: a construção de um mito na ciência brasileira*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1995.

CASTRO-SANTOS, L. A. de. O pensamento sanitarista na Primeira República: uma ideologia de construção da nacionalidade. *Dados*, 28(2): 193-210, 1985.

CASTRO-SANTOS, L. A. de. *Power, Ideology and Public Health in Brazil (1889-1930)*, 1987. Tese de Doutorado, Cambridge: Harvard University.

CHAGAS, C. *Trypanosoma minasense*: nota preliminar. *Brasil Médico*, 22(48): 471, 1908.

CHAGAS, C. Neue Trypanosomen: Vorläufige mitteilung. *Archiv für Schiffs-und Tropen-Hygiene*, 13: 120-122, 1909a.

CHAGAS, C. Nouvelle espece de trypanosomiase humaine. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 2(6): 304-307, 1909b.

[6] Um marco fundamental desse processo foram as pesquisas realizadas durante a década de 1940 no Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas, posto do Instituto Oswaldo Cruz localizado no município de Bambuí, em Minas Gerais. Liderado por Emmanuel Dias, o grupo de Bambuí produziu conhecimentos decisivos relativos à caracterização clínica da doença – em especial em sua forma cardíaca – e às técnicas para sua prevenção, mediante aplicação de inseticidas de ação residual nas moradias (Kropf, 2005, 2009; Kropf, Azevedo & Ferreira, 2003).

[7] Em 1950, a doença de Chagas foi incluída na agenda das campanhas do Serviço Nacional de Malária, do Ministério da Educação e Saúde, inaugurando-se, em Uberaba, a primeira campanha de profilaxia.

CHAGAS, C. Nova especie morbida do homem, produzida por um *Trypanozoma (Trypanozoma cruzi)*: nota previa. *Brasil Médico*, 23(16): 161, 1909c.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2): 159-218, 1909d.

CHAGAS, C. Trabalho do Instituto de Manguinhos sobre uma nova tripanossomíase humana, pelo dr. Carlos Chagas, assistente do Instituto. *Anais da Academia de Medicina do Rio de Janeiro*, 75: 188-190, 1909e.

CHAGAS, C. Uber eine neue trypanosomiasis des menschen. *Archiv für Schiffs-und Tropen-Hygiene*, 13: 351-353, 1909f.

CHAGAS, C. Nova entidade morbida do homem. *Brasil Médico*, 24 (43, 44, 45): 423-428, 433-437, 443-447, 1910.

CHAGAS, C. Aula inaugural da Cadeira de Medicina Tropical – 14 de setembro de 1926. *In*: CHAGAS, C. *Discursos e Conferências*. Rio de Janeiro: A Noite, 1935.

CHAGAS FILHO, C. *Meu Pai*. Rio de Janeiro: Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz, 1993.

COURA, J. R. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre doença de Chagas. *In*: DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. (Orgs.). *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1997.

COUTINHO, M. Ninety years of Chagas' disease: a success story at the periphery. *Social Studies of Science*, 29(4): 519-549, 1999.

COUTINHO, M. Tropical Medicine in Brazil: the case of Chagas' disease. *In*: ARMUS, D. (Ed.). *Disease in the History of Modern Latin America: from malaria to Aids*. Durham, London: Duke University Press, 2003.

DELAPORTE, F. *A Doença de Chagas: história de uma calamidade continental*. Ribeirão Preto: Holos, 2003.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cadernos de Saúde Pública*, 23, supl. 1: S13-S22, 2007.

DIAS, J. C. P.; PRATA, A. & CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas' disease control: in search of a realistic analysis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(2): 193-196, 2008.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Programa Integrado de Doença de Chagas da Fiocruz. *Portal Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2007. Disponível em: <www.fiocruz.br/chagas>. Acesso em: 28 set. 2008.

HOCHMAN, G. *A Era do Saneamento: as bases da política de saúde pública no Brasil*. São Paulo: Hucitec, Anpocs, 1998.

KROPF, S. P. *Doença de Chagas, Doença do Brasil: ciência, saúde e nação (1909-1962)*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2009.

KROPF, S. P. & HOCHMAN, G. Chagas, Carlos Ribeiro Justiniano. *In*: BYNUM, W. F. & BYNUM, H. (Eds.) *Dictionary of Medical Biography*. Connecticut, London: Greenwood Press, 2007. v. 1.

KROPF, S. P.; AZEVEDO, N. & FERREIRA, L. O. Biomedical research and public health in Brazil: the case of Chagas' disease (1909-1950). *Social History of Medicine*, 16(1): 111-129, 2003.

LABRA, M. E. *O Movimento Sanitarista nos Anos 20: da conexão sanitária internacional à especialização em saúde pública no Brasil*, 1985. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Escola Brasileira de Administração Pública, Fundação Getulio Vargas.

LIMA, N. T. *Um Sertão Chamado Brasil: intelectuais e representação geográfica da identidade nacional*. Rio de Janeiro: Revan, Iuperj, 1999.

LIMA, N. T. & BRITTO, N. Salud y nación: propuesta para el saneamiento rural: un estudio de la revista Saúde (1918-1919). *In*: CUETO, M. (Ed.). *Salud, Cultura y Sociedad en América Latina: nuevas perspectivas históricas*. Lima: IEP, Organización Panamericana de la Salud, 1996.

LIMA, N. T. & HOCHMAN, G. Condenado pela raça, absolvido pela medicina: o Brasil descoberto pelo movimento sanitarista da Primeira República. *In*: MAIO, M. C. & SANTOS, R. V. (Orgs.). *Raça, Ciência e Sociedade*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, Centro Cultural Centro do Brasil, 1996.

LIMA, N. T. & HOCHMAN, G. Pouca saúde e muita saúva: sanitarismo, interpretações do país e ciências sociais. *In*: HOCHMAN, G. & ARMUS, D. (Orgs.). *Cuidar, Controlar, Curar: ensaios históricos sobre saúde e doença na America Latina*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2004.

MAGALHÃES, O. de. *Un Poco da la Vida de Carlos Chagas*. Mendoza: Best Hermanos, 1944.

MOREL, C. M. Chagas' disease: from discovery to control - and beyond: history, myths and lessons to take home. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, supl.: 3-16, 1999.

PERLETH, M. *Historical Aspects of American Tripanosomiasis (Chagas' disease)*. Frankfurt am Main: Peter Lang, 1997.

REZENDE, J. M. de. Carlos Chagas. *Revista Goiana de Medicina*, 5(4): 285-302, 1959.

SÁ, M. R. The history of tropical medicine in Brazil: the discovery of *Trypanosoma cruzi* by Carlos Chagas and the German school of protozoology. *Parassitologia*, 47(3-4): 309-17, 2005.

STEPAN, N. L. *Beginnings of Brazilian Science: Oswaldo Cruz, medical research and policy, 1890-1920*. New York: Science History Publications, 1976.

STEPAN, N. L. *Picturing Tropical Nature*. London: Reaktion Books, 2001.

WORBOYS, M. Tropical diseases. *In*: BYNUM, W. F. & PORTER, R. (Eds.). *Companion Encyclopedia of the History of Medicine*. London, New York: Routledge, 1997. v. 1.

O Futuro da Pesquisa em Doença de Chagas e o Legado de Carlos Chagas

Tania C. de Araújo-Jorge
Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Maria de Nazaré Correia Soeiro
Departamento de Ultra-Estrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz
Programa Integrado de Doença de Chagas/Fiocruz

Joseli Lannes-Vieira
Laboratório de Biologia das Interações, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz
Programa Integrado de Doença de Chagas/Fiocruz

Ao celebrar a descoberta de Carlos Chagas precisamos refletir sobre o futuro a partir de sua herança. Chagas morreu aos 56 anos, depois de ter trabalhado em pesquisa por 32 anos, 17 dos quais dirigindo o Instituto Oswaldo Cruz. Ele realizou outros feitos que já trariam destaque à carreira de um pesquisador, como a descoberta do *Pneumocystis carinii* e a demonstração da importância dos mosquitos domésticos na transmissão da malária, com a conseqüente defesa e implantação da estratégia de combate aos anofelinos com inseticidas diretamente nas moradias. Mas o que eternizou Chagas na história da medicina foi este fato único: a descrição pelo mesmo cientista de uma nova doença (a tripanossomíase americana), seu agente causal (o *Trypanossoma cruzi*), seu vetor (triatomíneos), seu ciclo de vida e reservatórios silvestres, seus aspectos clínicos e epidemiológicos, além de ter opinado sobre as possíveis conseqüências a longo prazo.

O Brasil e demais países da América Latina construíram neste tempo pós-Chagas uma comunidade científica forte, consolidada e competente, que se dedica ao estudo básico e ao desenvolvimento de tecnologias e inovações moleculares, biológicas e sociais, visando tanto a promover ações que controlem esta endemia e melhorem o prognóstico dos pacientes, quanto

a contribuir para diversos campos da medicina tropical, incluindo aqueles relacionados à outras doenças parasitárias transmitidas por insetos-vetores, pautando a discussão da realidade sanitária e social de países acometidos por doenças de caráter negligenciado, da qual faz parte a doença de Chagas. Assim, se faz possível aplicar e traduzir tudo o que se aprendeu com a doença de Chagas a outras áreas de investigação, desde outras doenças infecciosas até doenças crônicas, degenerativas e genéticas que caracterizam o perfil epidemiológico brasileiro no século XXI.

O que destacar da herança de Carlos Chagas para nortear propostas futuras? Os desdobramentos de sua ciência e/ou de sua atuação política à frente do Instituto? Os desdobramentos de suas atividades como formador de cientistas com espírito fortemente humanista e artístico?

Optamos por desenvolver neste capítulo dois tópicos. O primeiro se refere às tendências e desafios no campo da ciência. O segundo está associado às lições que podemos tirar da experiência de Carlos Chagas para educar a imaginação das gerações futuras. A pesquisa em doença de Chagas foi estruturante para a ciência brasileira e para a formação de várias gerações de cientistas. Por isso é oportuno indagar quais são as prioridades da atual geração de pesquisadores que trabalham com esta doença.

TENDÊNCIAS E DESAFIOS NO CAMPO DA CIÊNCIA

Desde a sua descoberta, a doença de Chagas é ao mesmo tempo um enorme desafio para o campo das políticas públicas em saúde coletiva e um belo modelo biológico para explorar complexidades da vida unicelular, da relação parasito-hospedeiro e da biologia dos ciclos de transmissão parasitária. Sob a ótica da herança de Chagas aos brasileiros, é essencial a geração de novos conhecimentos e sua tradução em benefícios para as populações atingidas pela doença. Chagas foi o primeiro defensor da *translational research*, traduzida no Brasil como "pesquisa translacional", para indicar a necessária tradução (*translation*) de conhecimentos gerados na pesquisa laboratorial em produtos e procedimentos aplicados no sistema de saúde. Isso está explícito, por exemplo, em sua conferência na Academia Nacional de Medicina, na qual a questão da relevância do problema de saúde é destacada em paralelo à defesa de medidas profiláticas:

> a Central do Brasil vae se internando no Norte de Minas em zonas onde grassa intensamente a molestia, e que as residencias permanentes dos operarios desta via-ferrea, em zonas contaminadas, offerecem abrigo dos mais propicios ao insecto. Entre os trabalhadores da Central, nos filhos, principalmente, dos operarios desta Estrada, colhemos grande numero de nossas observações clinicas e pudemos observar muitos obitos, occasionados pela thyreoidite parasitaria. *Medidas sanitarias nesse sentido, visando, sobretudo, modificar as condições de habitabilidade* dos empregados da linha, importariam, sem duvida, em acto administrativo do maior proveito.
>
> *Apresentará, meus senhores, difficuldades invenciveis a campanha prophylatica salvadora, necessaria á solução deste alto problema de Estado?*
>
> Cumpre salientar que *o principal facto epidemiologico da molestia é constituido por um insecto, companheiro constante do homem nos domicilios e, por isso mesmo, facilmente attingivel ás medidas de destruição.* Recuar diante do inimigo tão mesquinho, deixar o campo livre á sua acção devastadora, fôra, sem duvida, a mais alta expressão da ausencia de energia em um povo civilisado. (...) Entre nós a iniciativa de medidas sanitarias justifica-se, sem duvida, em considerações bem mais elevadas: *é o futuro de um grande povo que se deverá zelar*; são deveres de humanidade e de patriotismo que devem actuar no espirito progressista dos homens de estado; *é a vida humana, é progresso material*, o aperfeiçoamento

de uma raça que degenera, o obstaculo ao trabalho productivo e a grandeza economica de vastas zonas do paiz; é, finalmente, o alto problema do povoamento do sólo por individuos fortes, tudo indicando a urgencia de medidas sanitarias capazes de attenuar a acção malefica do *Conorrhinus megistus*.

Agradecendo, Exmo. Sr. Presidente da Republica, a presença altamente honrosa de V. Ex. hoje nesta casa, eu tomo a liberdade de affirmar que della me advem a confiança animadora de que *os poderes publicos de meu paiz, de accôrdo com as suas normas de alta politica, saberão zelar o interesse collectivo, voltando attenção valiosa para esse assumpto medico de real importância pratica.* (Chagas, 1911: 28 – grifos nossos)

O histórico do controle da doença de Chagas no Brasil, sumarizado no Quadro 1, é um exemplo de grande sucesso de uma estratégia de intervenção num problema grave de saúde do país, baseada em evidências científicas e em políticas públicas construídas em parceria entre a comunidade científica e os serviços de saúde, portanto, um grande exemplo de pesquisa translacional.

Quadro 1 – Histórico das ações decisivas para o controle da doença de Chagas no Brasil

1943 –	Criação do centro de pesquisas do Instituto Oswaldo Cruz em Bambuí (MG)
1948 –	Ensaios de campo com o gamexane (isômero gama do hexa-cloro-ciclohexano ou BHC)
1950 –	Primeiras campanhas
1963 –	Priorização do controle da doença de Chagas no estado de São Paulo
1975 –	Instituição de programa de alcance nacional, com inquérito nacional de soro-prevalência na população rural, inquérito entomológico nacional, inquérito eletrocardiográfico e sistematização metodológica
1980 –	Cobertura integral da área considerada endêmica, introdução dos piretróides sintéticos
1991 –	Criação da Iniciativa do Cone Sul (Incosur)
1999 –	Início do processo de certificação da interrupção da transmissão vetorial por *Triatoma infestans*, descentralização progressiva de operações de campo
2001 –	Inquérito nacional de soro-prevalência: avaliação do impacto das ações de controle
2006 –	Certificação da interrupção da transmissão vetorial por *T. infestans*

Em 2002 a Organização Mundial de Saúde (OMS), através de seu Programa de Pesquisa em Doenças Tropicais (TDR), divulgou um instrumento de gestão para prioridades de pesquisa denominado "ênfases estratégicas", estruturado em quatro grandes áreas em que se fazia necessário gerar: conhecimentos básicos, ferramentas de diagnóstico e controle, métodos de intervenção para ação em saúde pública e estratégias e políticas (Remme *et al.*, 2002). No caso da doença de Chagas, foram identificados como ênfases estratégicas:

1) Novos conhecimentos necessários: a) bioinformática e genômica aplicada para identificar novos alvos e vias metabólicas e elucidar mecanismos de patogênese e fatores de risco; b) estudos genéticos e entomológicos em vetores (ex.: mecanismos de resistência, adaptação a mudanças ecológicas).

2) Novas ferramentas necessárias: a) descoberta e desenvolvimento de novas drogas; b) pesquisa clínica em marcadores de prognóstico da doença.

3) Novos métodos de intervenção necessários: a) desenvolvimento de métodos para o controle de vetores não-domiciliados; b) estudos de efetividade de inseticidas

e sua relação com a emergência de resistência de vetores; c) avaliação de ferramentas de detecção de vetores em áreas com baixa densidade de transmissão; d) avaliação de diagnóstico não convencional;

4) Novas estratégias e políticas necessárias: a) melhoria da estratégia de controle de triatomíneos não domiciliados; b) desenvolvimento de estratégias para controle de expansão da infecção na Amazônia; c) definição de novos indicadores de programas de controle; d) identificação de determinantes da implementação efetiva de programas de controle de sangue sem *Tripanossoma cruzi*.

O Ministério da Saúde realizou, de 2006 a 2008, uma série de oficinas de trabalho com um grupo de especialistas visando à definição de prioridades para a pesquisa em doenças negligenciadas que iriam receber fomento induzido. O principal objetivo era apoiar "projetos de pesquisa que contribuíssem de modo efetivo para o avanço do conhecimento, a geração de produtos e que dessem subsídios para a formulação, implementação e avaliação de ações públicas voltadas para melhoria das condições" de saúde da população brasileira e para a superação de desigualdades regionais e socioeconômicas (Edital MCT-CNPq/MS-SCTIE-Decit n. 25/2006).

Para implementar essa política dois editais foram divulgados, um em 2006 e outro em 2008, totalizando um investimento de 37 milhões de reais em quatro anos. No edital de 2006, constavam seis doenças, no de 2008 havia sete: dengue, doença de Chagas,[1] esquistossomose, hanseníase, leishmanioses, malária e tuberculose. Entre elas, tuberculose e doença de Chagas são responsáveis por uma alta carga de mortalidade, acometendo cerca de cinco mil brasileiros por ano; síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/Aids) e diarréias infecciosas ultrapassam tuberculose e doença de Chagas em impacto numérico na mortalidade, mas não são consideradas "negligenciadas", uma vez que acometem também populações de países desenvolvidos e recebem um volume de recursos para pesquisa e desenvolvimento tecnológico muito mais importante (Yamey, 2002; Hotez *et al.*, 2008).

Pelos registros no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde (MS/SVS/Dasis), o número absoluto de óbitos por doença de Chagas vem caindo lentamente (em 1996 – 5.376, em 2000 – 5.134, em 2005 – 4.916), fruto combinado de diferentes fatores que incluem a melhoria na atenção ao portador de doença de Chagas crônica, a redução da incidência de novos casos agudos como resultado do controle eficiente do principal vetor (o *T. infestans*) e, conseqüentemente, a diminuição do ingresso de novos casos crônicos evoluindo para a mortalidade. A queda mais acentuada na taxa relativa de mortalidade, que reflete o número de óbitos por 100 mil habitantes, é resultado da combinação destes fatores associada ao aumento da população brasileira no período.

Mas além da mortalidade direta, que, no caso da doença de Chagas se estende da terceira à oitava década de vida, a doença atinge seus portadores com alta morbidade, reduzindo a qualidade de vida e a capacidade produtiva, trazendo estigma e depressão, impactando nos custos do Sistema Único de Saúde (SUS) com implantes de marca-passo e cirurgias de transplante cardíaco. De fato, em linhas gerais, a doença de Chagas não é democrática, uma vez que o paciente chagásico pertence a um segmento de baixa estratificação social, excluído pela inexorável conjunção pobreza/doença e, por isso, com reduzido poder de reivindicação e pouca, ou mesmo nenhuma, visibilidade política, diferentemente de outras patologias (por

[1] A convite do professor Carlos Morel, Tania C. de Araújo-Jorge coordenou as duas oficinas para doença de Chagas.

exemplo, a Aids), que têm conquistado prioridades por parte do poder público (Oliveira, 2005). Apesar dos relativos sucessos dos programas de controle e vigilância, há que se manter alerta para as necessidades de investigação científica, de modo a suprir lacunas importantes de conhecimentos, métodos e estratégias de intervenção, como indicado nas ênfases estratégicas do TDR/OMS. Por isso abordamos a seguir as tendências da pesquisa no Brasil.

Nas oficinas realizadas pelo Ministério da Saúde referentes à doença de Chagas, identificaram-se as atuais lacunas e os desafios que precisam ser trabalhados para gerar dados necessários à proposição de intervenções com políticas públicas conseqüentes que visem ao controle da transmissão, vigilância epidemiológica, atenção e tratamento dos pacientes. Essas lacunas se referem tanto a questões relacionadas à 'fase aguda' da doença de Chagas, ou seja, a novos casos de infecção pelo *T. cruzi*, como às associadas à 'fase crônica', concernente ao manejo e cuidado aos pacientes já infectados. A seguir, listam-se os 21 temas indicados em ambos editais e indicam-se as necessidades atuais de investigação sobre a doença no Brasil.

Doença de Chagas aguda

1) Aprimoramento de métodos de diagnóstico: parasito-lógico, sorológico, bioquímico.

2) Resposta clínica, imune e parasitológica ao protocolo atual de tratamento e a protocolos de associação medicamentosa.

3) Estudos de transmissão, incidência, prevalência, seguimento e monitoramento clínico, com ênfase na região Amazônica – determinação dos mecanismos de transmissão de *T. cruzi* para humanos; ecologia dos ciclos de transmissão e avaliação de riscos e impacto do desmatamento; caracterização das espécies de triatomíneos; relações sistemáticas e filogenéticas das populações de vetores; mapeamento de ecótopos; processo de domiciliação e potencial vetorial; isolamento de cepas de *T. cruzi* e genotipagem; determinação de suscetibilidade a drogas utilizadas no tratamento; desenvolvimento de estudos clínico-parasitológicos de pacientes de casos autóctones, com ênfase na clínica da fase aguda por transmissão oral; inovação em tecnologias de controle de vetores e vigilância entomológica; estudos de georreferenciamento de casos agudos e transmissão vetorial; desenvolvimento de sistemas de integração e disponibilização de dados (casos humanos e vetores).

4) Controle da doença e controle do vetor fora da região Amazônica: reconhecimento de espécies, características da distribuição em ecótopos naturais e do peridomicílio, estudo da capacidade e competência vetorial, em especial das espécies *Panstrongylus megistus, Triatoma braziliensis, Triatoma pseudomaculata, Triatoma sordida, Triatoma rubrovaria, Panstrongylus lutzi*; estudo sobre os padrões físicos das moradias e sua vulnerabilidade à invasão ou instalação do vetor; identificação de vetores potencialmente relacionados com surtos (microepidemias); estudos de biologia do vetor, fonte alimentar e/ou de sua interação com grupos de *T. cruzi*.

5) Vigilância epidemiológica: ciclos de transmissão silvestre; mapeamento de áreas de risco (georeferenciamento) e análises clínicas de morbidade; novos métodos de vigilância epidemiológica; caracterização dos isolados de *T. cruzi*.

6) Desenvolvimento de novas ferramentas taxonômicas para identificação de espécies crípticas características da distribuição dos vetores em ecótopos naturais e peridomicílio.

7) Estudos da capacidade e competência vetorial e de reservatórios.

8) Estudos de infecção por *Trypanosoma rangeli* e co-infecção com *T. cruzi*.

9) Desenvolvimento de sensibilidade e resistência de espécies de triatomíneos a inseticidas.

10) Novos métodos para identificação de fontes alimentares de triatomíneos.

DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

1) Testes rápidos e de baixo custo para identificação de casos crônicos em áreas endêmicas.

2) Marcadores de evolução e prognóstico; busca por marcadores moleculares em isolados do parasita que possibilitem identificar a transição entre os estágios clínicos da doença crônica, com uso de genômica, proteômica e novas tecnologias, com vistas a desenvolvimento de indicadores de prognóstico.

3) Imunidade e nutrição.

4) Marcadores genéticos preditivos da forma clínica da doença.

5) Estudos para identificação de marcadores de cura.

6) Otimização da terapêutica para a cardiopatia e uso do Benzonidazol (Bz) em associação a outros potenciais tripanocidas e/ou imunomoduladores.

7) Protocolos alternativos para uso do Bz: resposta clínica e imunológica a variações de tempo e dose em diferentes formas clínicas; marcadores de resistência do *T. cruzi* a drogas; estudos do perfil de resistência a drogas dos parasitos isolados de diferentes formas clínicas, regiões geográficas e sua associação aos grupos de *T. cruzi*.

8) Novas drogas, associação medicamentosa ao Bz e terapias alternativas (drogas com potencial terapêutico para *T. cruzi* e já existentes no mercado; ensaios pré-clínicos; padronização de ensaios de monitoramento de cura parasitológica para avaliação de tratamento (em rede associada com pesquisa clínica).

9) Estudos para esclarecimento da fisio e da imunopatogenia da doença crônica, em especial quanto a mecanismos de controle da multiplicação do *T. cruzi*.

10) Geoprocessamento e tecnologias da informação no acompanhamento clínico do paciente com aproveitamento do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS).

11) Educação e promoção da saúde: levantamento das necessidades e produção de materiais e ações educativas direcionadas à população sob risco, pacientes, profissionais da saúde e da educação.

Ao sistematizarmos essas perspectivas, estaremos fazendo um exercício de prospecção científica e tecnológica. Importantes desafios ainda demandam especial atenção e várias questões ainda em aberto podem ser identificadas, tais como:

1) Haverá o dia em que não tenhamos mais nenhum caso novo de infecção humana pelo *T. cruzi*, ou essa imagem é pura ficção? Em outras palavras, as medidas vigentes de controle da transmissão vetorial do parasito poderão no futuro controlar ou eliminar a doença de Chagas? Como identificar e definir as possibilidades de intervenção nessa

antropozoonose: erradicação, eliminação, controle? E quanto à relevância das novas características ecoepidemiológicas, da globalização e das mudanças climáticas? Qual o impacto na prevalência da infecção? O que pode ser feito?

2) O que falta ser conhecido sobre aspectos da biologia do *T. cruzi*, de seus hospedeiros e de sua interação?

3) Que novas medidas profiláticas (seria a vacina uma possibilidade real para profilaxia e imunoterapia?), terapêuticas (novas drogas tripanocidas, intervenções por terapia celular?), de diagnóstico e de cuidado ao paciente poderão ser oferecidas aos milhões de pessoas sob risco de infecção e aos outros tantos milhões de portadores da infecção pelo *T. cruzi*? E quanto ao nosso atual sistema de saúde, estará ele apto a atender a estas pessoas com qualidade e eficácia?

4) Saberemos um dia explicar perfeitamente quais são mecanismos patogênicos que levam à manifestação e progressão da doença de Chagas?

5) As atuais ações educativas desenvolvidas com os profissionais de saúde e a sociedade são satisfatórias e suficientes para o conhecimento desta parasitose? Elas contribuem para a prevenção da infecção e controle da doença? O que mais pode ser feito?

De fato, por um lado, comemoramos as expressivas conquistas relacionadas às medidas de controle da transmissão da doença de Chagas (Quadro 1), principalmente devido à articulação de políticas instituídas por vários países afetados, como Argentina, Brasil, Chile, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Peru (Iniciativa do Cone Sul), e que por sua vez resultaram na marcante redução na incidência e número de novos casos, servindo de exemplo a ser copiado por outras iniciativas, como a dos Países Andinos e a da América Central. Por outro lado, as estimativas atuais indicam que esta antiga antropozoonose atinge cerca de 12 a 14 milhões de pessoas na América Latina (Dias, 2007). No Brasil, o programa de controle da doença (1975-1995) custou 516 milhões de dólares, dos quais 78% foram gastos com controle vetorial e 4% com a melhoria das habitações. Este programa resultou na prevenção de 277.000 novas infecções e na prevenção de 85.000 mortes. A análise da relação custo/benefício econômico mostrou que, para cada dólar gasto no programa de controle (vetorial e transfusional), houve uma economia de dois dólares e 0,19 centavos de dólar, respectivamente (Hotez *et al.*, 2004).

A importância médica da doença de Chagas precede sua descoberta, uma vez que material genético do *T. cruzi* foi encontrado em múmias datadas de 9.000 e 7.000 anos a. C em áreas do Chile e do Brasil, respectivamente (Aufderheide *et al.*, 2004, Lima *et al.*, 2008). Esta parasitose apresenta o ciclo doméstico, peridomiciliar e silvestre, podendo o parasito alternar seu desenvolvimento em diferentes espécies de hospedeiros vertebrados e invertebrados. É possível controlá-la, eliminá-la, erradicá-la ou extingui-la? Segundo Hotez *et al.* (2004), compreende-se como: 1) controle: a redução de incidência, prevalência, morbidade e mortalidade da doença a níveis aceitáveis determinados pelo país ou área em questão; 2) eliminação: a redução a zero da incidência da doença em uma determinada área geográfica, requerendo ainda contínuas ações e políticas de saúde pública de modo a prevenir a reemergência; 3) erradicação: a redução da incidência da doença a zero, não havendo mais necessidade de intervenções; 4) extinção: a erradicação do patógeno e destruição de todas amostras laboratoriais.

Concomitantemente ao controle da doença, a eliminação e erradicação dependem das características biológicas do parasito e de seus hospedeiros e requerem uma determinação política e a garantia de recursos para implementar estas ações. Com relação à doença de

Chagas, apesar da transmissão ter sido significantemente controlada em vários países do Cone Sul através do controle da transmissão vetorial e transfusional, ela ainda não poderá ser eliminada com as ferramentas atualmente disponíveis. Sabemos que as medidas de controle químico, e mesmo biológico, eficazes no ciclo doméstico não se aplicam aos outros ciclos, inviabilizando a erradicação e extinção desta parasitose. Cabe-nos então responsabilidade pela vigilância epidemiológica e entomológica, com manutenção e gestão do controle do ciclo domiciliar e monitoramento e controle epidemiológico dos demais. Apesar da transmissão pelo *T. infestans* – principal vetor da doença encontrado, sobretudo, em casas e em áreas peridomiciliares – estar controlada no Uruguai, Chile, Brasil e em muitas regiões endêmicas na Argentina, é importante ressaltar que várias outras dezenas de espécies da subfamília Triatominae (*Rhodnius prolixus*, *T. braziliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma pseudomaculata*, *P. megistus*, entre outras) são também consideradas potenciais vetores da doença na América Latina, podendo ocupar o nicho vago pela eliminação do *T. infestans* (Téllez-Meneses *et al.*, 2008; Polonio *et al.*, 2008).

Soma-se ainda a este quadro uma mudança no perfil epidemiológico da doença no Brasil, como apontado no documento do Ministério da Saúde de 2005, intitulado *Consenso Brasileiro sobre Doença de Chagas* (www.saude.to.gov.br/pagina_adm/download/consenso_chagas.pdf): há recentes relatos de casos agudos causados por surtos de infecção via oral, aumentou o número de casos crônicos indeterminados identificados na Amazônia e vêm ocorrendo novos casos em países não endêmicos como Estados Unidos da América, França, Inglaterra, Japão e Espanha em decorrência das migrações populacionais, com transmissão por sangue/derivados e pela via congênita (Schmunis, 2007; Dias, 2007; Coura, 2007).

Assim, no atual contexto, evidencia-se a necessidade de promover ações ou medidas para: 1) dar sustentação às táticas de controle de transmissão da doença e às medidas de vigilância epidemiológica; 2) prover políticas de saúde pública, garantindo ainda melhores condições habitacionais; 3) estimular a adoção de medidas socioeducativas de populações sob risco de contrair a doença e a capacitação de agentes educacionais e profissionais de saúde; 4) oferecer o cuidado ao paciente de modo integrado e interdisciplinar; 5) buscar a identificação de novas opções para o adequado tratamento dos pacientes chagásicos, incluindo os crônicos (Schofield, Jannin & Salvatella, 2006; Dias, 2007; Coura, 2007).

Outro importante desafio refere-se à terapia atual, relacionada ao uso de dois compostos – o Benzonidazol (Bz) e o Nifurtimox. Ambos estão longe do ideal por apresentarem baixa atividade sobre a fase crônica tardia, induzirem sérios efeitos colaterais e possuírem limitada eficácia sobre os diferentes biodemas do *T. cruzi* que circulam em distintas áreas geográficas (Coura & De Castro, 2002). Assim, identifica-se a urgência de se obter investimentos para desenvolver novas alternativas terapêuticas e mesmo profiláticas mais seletivas, tendo por base a identificação de vias e alvos metabólicos do parasito e testes de compostos/produtos já correntemente utilizados em outras patologias (revisto em Soeiro & De Castro, 2009).

De fato, apesar da eficiência do Bz no tratamento de pacientes agudos e crônicos recentes, sua aplicação em pacientes crônicos é ainda controversa, embora recentemente tenha apresentado resultados satisfatórios sobre a atuação em retardar ou mesmo evitar a evolução da cardiopatia crônica (Viotti *et al.*, 2009). Atualmente, este medicamento é produzido no Brasil por um laboratório público (Lafepe), inclusive com formulações pediátricas, estando em curso uma avaliação clínica multicêntrica e duplo-cega referente ao seu efeito sobre pacientes crônicos – Programa Benefit (Marin-Neto *et al.*, 2008), o que permitirá compreender melhor os benefícios e riscos da terapia tripanocida na prevenção da progressão das manifestações crônicas em pacientes chagásicos.

Um dos atuais desafios no acompanhamento de estratégias terapêuticas é o estabelecimento de critérios de cura (Marin-Neto *et al.*, 2008). A ausência de métodos confiáveis e de padrão-ouro para o diagnóstico e acompanhamento de tratamento tem levado muitas vezes a resultados divergentes e controversos, de modo que o estabelecimento destes critérios e padrão representam, ainda hoje, necessidades na pesquisa em doença de Chagas. Estudos recentes vêm confirmando a eficiência do emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA do *T. cruzi* como uma ferramenta para acompanhar a eficácia de tratamento e detecção precoce de falha terapêutica. Recentemente a OMS/TDR e a Organização Pan-Americana de Saúde (Opas) vêm orquestrando um consórcio de pesquisadores visando à padronização e validação da PCR para uso clínico em diagnóstico e acompanhamento de tratamento e de novos medicamentos tripanocidas (Britto, no prelo).

Com relação aos mecanismos patogênicos envolvidos nas manifestações clínicas crônicas, sobretudo a cardiomiopatia que resulta na forma mais grave da doença – a insuficiência cardíaca –, estudos em pacientes e modelos experimentais têm sugerido que a contínua e progressiva lesão de células cardíacas, levando à fibrose progressiva e disfunção cardíaca, está associada à persistência do *T. cruzi* em sítios-alvo, induzindo e mantendo as reatividades inflamatórias crônicas, bem como à desregulação da resposta imune específica ou não a moléculas do parasito (Higuchi *et al.*, 2003; Marin-Neto *et al.*, 2007, Lannes-Vieira *et al.*, no prelo). Desta forma, a compreensão da relação parasito/hospedeiro e dos fatores desencadeantes da doença pode contribuir para o desenho de intervenções terapêuticas racionais que visem ao controle da inflamação crônica, manutenção do controle do parasito e regeneração da função cardíaca, melhorando o prognóstico dos pacientes em processo de evolução clínica.

Levando em consideração os problemas mencionados, vale ainda indagar o que cabe a ciência fazer em relação a todas estas questões? Aproveitamos este momento de celebração da descoberta de Chagas para refletir sobre o impacto de tal fato no desenvolvimento de gerações de pesquisadores, médicos, sanitaristas e pessoas envolvidas no desenho de políticas públicas de saúde. Esta também é uma oportunidade para firmar compromissos que dêem continuidade aos avanços conquistados e que busquem o enfrentamento real dos desafios atuais, sobretudo o cuidar das pessoas infectadas e em evolução clínica, e o educar, diminuindo o risco de infecção.

COMPROMISSOS E DESAFIOS PARA EDUCAR A IMAGINAÇÃO DAS GERAÇÕES FUTURAS

> *Não vai demorar que passemos adiante*
> *uma grande e bela ciência,*
> *que faz arte em defesa da vida.*
> Chagas, 1928

Essa frase emblemática de Chagas nos inspira. Passar adiante a ciência. A grande ciência. A bela ciência. A arte em defesa da vida. Feita pela grande e bela ciência. Como desdobrar essas palavras em mais perspectivas de conscientização e incorporação do legado de Chagas?

Em seu livro *Centelhas de Gênios*, Robert e Michelle Root-Bernstein (2000) nos propõem "ferramentas para educar a imaginação", que são largamente usadas por cientistas e artistas e que deveriam ser ensinadas em todos os níveis de educação. São elas: observar, evocar imagens, abstrair, reconhecer padrões, formar padrões, pensar com o corpo, ter empatia,

pensar de modo dimensional, estabelecer analogias, criar modelos, brincar, transformar, sintetizar. Chagas foi treinado intensamente nessas ferramentas durante a vida e as usou em seu trabalho seminal. Foi um clínico investigador e formador de cientistas, tendo em Emmanuel Dias seu mais destacado discípulo. Como educar a imaginação das gerações futuras à luz do legado de Chagas?

Todos os pesquisadores que trabalham com *T. cruzi* são apresentados ao parasito com as belas imagens atualmente disponíveis, em diferentes modalidades de microscopia que se combinam na microscopia correlativa (ver a página da Fiocruz <www.fiocruz.br/chagas>). Essas imagens científicas refletem também as perguntas de cada época, tais como a biologia do parasita, desde os trabalhos de Chagas, e da interação parasita-hospedeiro, nas décadas de 1970 e 1980. Com certeza, muitos pesquisadores não foram apresentados ao universo de questões levantadas por Carlos Chagas a partir do conhecimento da própria doença, suas mazelas sociais, suas conseqüências clínicas e cardiológicas, mas sim através da beleza das imagens do *T. cruzi* e de sua interação com a célula hospedeira. É possível articular a beleza na ciência com o sofrimento na vida do paciente? E como sensibilizar as novas gerações de cientistas, educadores e profissionais de saúde para os problemas contemporâneos causados pela doença de Chagas que acabamos de apresentar? Foi Carlos Chagas Filho que, no Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por ele criado, cunhou a máxima hoje adotada por muitos, com certeza sob a influência de seu pai: "ensina-se porque se pesquisa".

Relações íntimas da pesquisa com o ensino e a educação da imaginação: exemplo do legado de Chagas para as futuras gerações

Para abordar este tema, refizemos o percurso da vida de Carlos Chagas e revisitamos seus trabalhos com algumas perguntas. Além do contexto científico, o contexto artístico e cultural no qual Chagas viveu influenciou seu olhar, sua imaginação, sua intuição, sua dedução e sua fantasia? Qual era esse contexto? O que sabemos da influência do contexto artístico sobre a atividade de Carlos Chagas como cientista e sua descoberta? Que contexto artístico, científico e político mundial e brasileiro condicionaram suas idéias? Que livros lia? Que poesias lhe falavam à alma? Que pinturas e esculturas o impressionavam? De que músicas gostava? Nos relatos das suas publicações sobre a descoberta da nova doença, podemos perceber descrição objetiva, dedução, intuição, fantasia e imaginação?

Durante sua formação até a idade adulta, Chagas estava imerso num ambiente artístico e político de um tempo extremamente pulsante de inovações e mudanças. Segundo seu filho, Chagas lia Rui Barbosa, Joaquim Nabuco, Manuel Joaquim de Almeida, Artur Azevedo, com predileção por Machado de Assis. É de Machado, em seu livro *Histórias sem Data: primas de Sapucaia*, a citação que tem muita relação com a descoberta de Chagas: "Palavra puxa palavra, uma idéia traz outra, e assim se faz um livro, um governo, ou uma revolução, alguns dizem que assim é que a natureza compôs as suas espécies".

Seguido uma linha do tempo da vida e das descobertas de Chagas e fazendo um paralelo com os acontecimentos políticos e culturais da época, organizamos um quadro em que destacamos alguns desses momentos:

1838 – Schleiden e Schwann propõem a teoria celular

1848 – Marx e Engels publicam o *Manifesto Comunista*

1859 – Darwin publica *A Origem das Espécies*

1859 – Pasteur demonstra a inexistência de geração espontânea dos microrganismos

1850-1900 – Realismo na pintura e na literatura

1874 – Primeira exposição impressionista coletiva

1878 – Nascimento de Carlos Chagas em Oliveira, Minas Gerais

1881 – Nascimento de Pablo Picasso

1881 – Publicação de *Memórias Póstumas de Brás Cubas* de Machado de Assis – início do realismo na literatura brasileira

1884 – Abolição da escravidão no Ceará e no Amazonas

1885-1886 – Carlos Chagas é alfabetizado na fazenda

1887 – Nascimento de Villa Lobos

1887 – Fundação da Academia Brasileira de Letras (Machado de Assis é o primeiro presidente)

1888 – Abolição da escravidão no Brasil

1888-1895 – Estudos de Chagas em São João del Rey

1889 – Proclamação da República por Deodoro da Fonseca

1896 – 1ª Guerra de Canudos

1897-1903 – Estudos de Chagas em Medicina no Rio de Janeiro

1898 – Camilo Golgi descreve o Aparelho de Golgi

1900 – Sigmund Freud publica *A Interpretação dos Sonhos*

1900 – Machado de Assis publica *Dom Casmurro*

1900 – Kodak produz a primeira máquina fotográfica pequena

1900 – Coca-cola é lançada na Europa

1900 – Estréia da ópera *Tosca*, de Giacomo Puccini

1900 – Morrem Eça de Queirós e Friedrich Nietzsche

1902 – Eleição de Rodrigues Alves

1905 – Einstein propõe a teoria da relatividade

1905 – Expressionismo na pintura (Wassily Kandinsky, Marc Chagall e outros)

1906 – Primeiro vôo de Santos Dumont

1907 – Cubismo na pintura (Pablo Picasso e outros)

1907 – Invenção da cultura de tecidos e seu aperfeiçoamento por Alexis Carrel em 1912

1908 – Descoberta do *Trypanosoma cruzi*

1909 – Descoberta da doença de Chagas

A infância, adolescência e juventude de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas refletem sua inserção social e a ligação – por amor – de duas famílias de origem social diferente. O pai, José Justiniano Chagas (Chagas era o nome de família materno, e Justiniano o paterno), dava seguimento ao veio comerciante da família, enquanto a mãe, Mariana Ribeiro de Castro, vinha de uma típica família de fazendeiros de café do interior de Minas Gerais. Chagas nasceu na fazenda Bom Retiro e viveu muitas perdas familiares, com a viuvez jovem da mãe e a morte de dois irmãos. Por seu papel ao lado da mãe, foi fortemente influenciado por tios maternos, dois médicos e dois políticos. Seu olhar foi forjado pela criação na fazenda e pelos estudos em Oliveira e São João Del Rey. Carlos Chagas Filho, em *Cenas da Vida de Carlos Chagas*, nos relata parte dessa vivência que educou o olhar de seu pai:

> Este, até a idade escolar, dividiu sua vida entre o Piau e Oliveira. Nas fazendas acostumou-se ao trato de gente simples e humilde. Simplicidade e humildade foram traços característicos de sua pessoa e a glória não os modificaria. Misturava-se com os filhos dos colonos e dos escravos nas brincadeiras de então: a pesca dos lambaris, relampejando nos fios de água cristalina dos regatos e riachos, a caça feita com o estilingue ou uma rara Flaubert, na tentativa de atingir as indefesas rolas pousadas nas laranjeiras, ou as ariscas narcejas coriscando nos brejos. Às vezes, a caçada era árdua e exigia atenção: pegar uma cascavel nem sempre é tarefa cômoda. (...) Havia ainda a domação de potros, em que os meninos procuravam copiar o desempenho dos famosos peões, que duas vezes por ano vinham às fazendas para atividade que se confunde com as imagens de "rodeio" que hoje vemos na televisão. Chagas Filho, 1979: 1)

Seu professor mais marcante foi o padre João Batista do Sacramento que, também segundo o relato de Carlos Chagas Filho, lhe explicava:

> o mundo natural que o cercava: o olhar perdido no horizonte, limitado ao longe pela serra de São José, fala-lhe do céu, das árvores, das riquezas da natureza, da terra. Mais ainda: envolve-o no mistério da arte colonial, tão presente no barroco da cidade, quando não desliza para ilustrar a mente do discípulo explicando-lhe a graça estilística de tal ou qual poeta. (...) Agradava-lhe brincar com os meninos, correr pelos campos em busca de pássaros e flores. Aos domingos, saía com os alunos para longos passeios onde lhes ensinava os segredos da natureza, ou, então, percorrendo a cidade, indicava-lhes a graça do barroco mineiro, que alcança em São João uma das suas expressões máximas. (...) Aos domingos e feriados, o padre Sacramento, acompanhado por alguns alunos – Chagas presente sempre –, saía pela cidade ou buscava o campo. Na cidade, explicava aos meninos a lindeza do traço das igrejas do pilar, do Carmo ou de São Francisco de Assis. Terá sido nessa ocasião que Chagas começou a interessar-se pelo Irmão Sol? (Chagas Filho, 1993: 24)

Foi com o mesmo padre Sacramento que o jovem Chagas se acostumou a olhar para os campos:

> Nele reencontrava o verde das matas das fazendas em que vivera, sentia o cheiro úmido das capoeiras brejadas, aspirava com vigor o forte odor dos parasitas e dos xaxins das matas virgens, que ainda as havia (...). Dava-lhes uma lição de história natural. Apanhava aqui ou ali uma flor e a classificava. Dava-lhe o nome científico e o vulgar. Mais ainda: dizia aos estudantes quais as suas utilidades. Pedia depois que algum menino, espontaneamente, fizesse o mesmo. Chagas com frequência apresentava-se como voluntário e, as vezes, chegava a dizer qual o gênero da planta, pois não se esquecera do que ouvira em ocasiões anteriores (...) Sacramento era, por igual, um bom zoólogo. Sabia reconhecer o canto de uma ave e distinguir os bichos ao longe, pelos sons que emitiam. Discriminava com facilidade, as características biológicas de cada roedor ou de animais de maior porte. (...) Foi Sacramento, sem dúvida, que, com seus conhecimentos de botânica e de zoologia, suscitou em meu pai o interesse pela biologia (...). Sentava-se à beira do rio das Mortes, pois este divide a cidade em duas, e contava aos seus alunos a história das Minas Gerais e da sua gente.(...) Dizia-lhes da tragédia da Inconfidência e dos castigos recebidos por aqueles que a haviam esposado. Acendia, assim, a chama da liberdade no coração da garotada. (...) Padre Sacramento era, ainda, bom para ler o céu, quando o passeio se prolongava. (...) reconhecia os milhares de estrelas que nos piscam, atadas ao fundo azul-negro do céu. Sabia dar informações precisas sobre as mais importantes. Distinguia os astros pelos nomes e se detinha, sobretudo, na descrição de Arcturo, estrela principal da constelação do Boieiro. (Chagas Filho, 1993: 25)

Portanto, o ambiente em que se deu a formação de Chagas exercitava uma das principais ferramentas da imaginação criativa, segundo R. Root-Bernstein e M. Root-Bernstein (2000): a observação cuidadosa do mundo natural. E isso se dava no contexto do barroco mineiro, que data do século XVIII e que era por ele muito apreciado. Durante sua infância e juventude (1885-1895), o olhar de Carlos Chagas foi 'educado' para 'perceber o que outros não vêem'

e isso é de grande relevância na educação da imaginação. Os relatos de Chagas Filho nos permitem concluir que seu pai exercitou muito essas ferramentas: observava, evocava imagens, abstraía, aprendeu a reconhecer e a formar padrões, a pensar com o corpo nas caçadas, pescarias e estudos na natureza, a ter empatia.

Empatia foi o sentimento decisivo que o fez optar pelos estudos médicos, em vez de atender ao desejo de sua mãe para ser engenheiro (Chagas chegou a ser reprovado na prova para a Escola de Engenharia de Ouro Preto). Durante sua educação médica e científica (1897 a 1903), ele reforçou essa percepção, foi educando a imaginação com os novos conhecimentos sobre ciclos complexos em que parasitos eram transmitidos por vetores, se apresentavam em diferentes modalidades em diferentes hospedeiros, causavam quadros clínicos de diferente gravidade em diferentes pessoas. Habituado ao transitar entre os pacientes e o microscópio, Chagas sabia pensar de modo dimensional, estabelecer analogias, criar modelos.

Chagas dominava e usava como poucos as ferramentas da imaginação criativa. Antes de sua clássica obra de 1909, já havia publicado doze trabalhos em seis anos. Até a descrição da doença de Chagas, ele trabalhou sobre hematologia (sua tese de graduação em medicina, em 1903) e profilaxia da malária, transitou com competência pela entomologia, entre culicídeos, anofelinos e triatomíneos, e também pela parasitologia, dentre diversos tripanossomas. Chagas reencontrava nos estudos e na pesquisa o prazer do brincar e, provavelmente, sabia que Albert Einstein e Bertrand Russel defendiam que a alegria e o humor deviam marcar o rumo de toda pesquisa científica. Tinha ainda grande facilidade de transformar e sintetizar.

No trabalho de 1909, reproduzido e comentado neste livro, podem ser reconhecidas as "ferramentas para educar a imaginação" já mencionadas (Chagas, 1909). Chagas observou os relatos dos habitantes do local; observou os insetos locais e seus hábitos; observou o sangue de animais e de pessoas do local; observou parasitas flagelados no intestino dos barbeiros, no sangue de animais experimentais; observou a patogenia para animais experimentais, as diferenças na sensibilidade à infecção dependendo do animal e da sua idade; observou a variabilidade da virulência do parasito; observou o modelo mais sensível (macacos Callithrix); observou os hospedeiros habituais naturais (homem e animais domésticos); observou a morfologia do parasita no sangue circulante do humano, do macaco, do cobaio, a morfologia do parasita no intestino médio e posterior do barbeiro, a morfologia do parasito em culturas artificiais, a diversidade morfológica nesses três sistemas (sangue, barbeiro, culturas), a morfologia do núcleo e do flagelo. Observou, observou, observou.

'Evocou todas as imagens' conhecidas do sangue de pacientes com malária. 'Reconheceu padrões' "no sangue periferico dos animais infetados o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta duas fazes distintas de evolução, a de organismos intraglobulares e a de flajelados livres no plasma" (Chagas, 1909; p. 167) e 'abstraiu', pois na realidade não havia os "organismos intraglobulares" tal como ocorre na malária. Aqui sua percepção foi enganada pelas imagens de parasitas superpostos às hemáceas nas lâminas sanguíneas, e pelo seu 'vício' em olhar parasitas de malária.

Observou, registrou e, além de reconhecer padrões, 'formou padrões', como nas suas figuras 13 a 24 na estampa 13 de seu trabalho de 1909, descritivas do parasito no inseto e em culturas artificiais. Chagas formou padrões, alguns até arbitrários, como ao propor a identificação de parasitas machos e fêmeas.

> A dualidade de fórma continúa evidente. E, admitindo diferenciação sexuada relativa á diversidade morfolojica, deveremos considerar femea a fórma com blefaroplasto menor, quazi sempre esferico, com nucleo ovoide de cromatina frouxa, nas colorações

> pelo GIEMSA, plasma mais largo. A outra fórma, de maior blefaroplasto, nucleo comprido e ovoide, plasma mais estreito, será, então, a fórma macha. Não temos idéa formada, por emquanto, respeito á relação numerica entre essas duas fórmas no correr da infeção; certo é, porém, que em dados momentos ha predominancia evidente de uma sobre a outra. (Chagas, 1909: 175)

'Estabeleceu analogias', como a que descreve com coccidios na estampa 13 de um de seus trabalhos: "o nucleo é esferico, com cariozoma central menor que na forma precedente; zona de suco nuclear clara, sem substancia cromatica e membrana espessa. É frequente nesta forma observar-se condição nuclear curioza, similar á verificada por JOLLOS nos coccidios e por ZÜLZER nos heliozoarios" (Chagas 1909: 173).

Chagas também 'criou modelos', como o de reprodução sexuada para os tripanossomas. Seu filho Evandro escreveu:

> Segundo o conceito da grande maioria dos protozoologistas, não existe para os trypanosomas cyclo sexuado; sua reproducção se dá independente do acto sexual, por uma perpetuidade do plasma nelles existentes. De accordo com Carlos Chagas é este conceito erroneo, no ponto de vista geral, porque todas as especies que vivem no organismo humano entram em degradação ao fim de certo tempo em virtude das multiplicações successivas, acarretando, desse modo, um exgottamento progressivo do plasma. Na malaria, por exemplo, o parasito, após algumas gerações successivas no sangue peripherico do organismo humano, se exgotta e dá origem as formas sexuadas. Esta transformação em gametocytos tem como razão a diminuição da vitalidade e como objectivo renovar pela fecundação as caracteristicas da especie. De accordo com Chagas o acto sexual constitue uma necessidade biologica e deve existir nos trypanosomas, embora ainda não completamente estudado. Segundo sua interpretação as duas formas do Trypanosoma cruzi encontradas no sangue circulante não representam mais do que elementos differenciados, sexualmente, para a realização da multiplicação por fecundação. (Chagas, 1935: 4)

Chagas demonstrava 'ter empatia', tanto pelos seus objetos de estudo como pelos seus colaboradores. Exemplo disso é a referência que fez a Ezequiel Dias, no discurso proferido no II Congresso Brasileiro de Hygiene, em 1924:

> E quem foi Ezequiel Dias? A alma mais pura e idealista que tenho encontrado na vida, uma das personalidades moraes mais perfeitas com quem tenho lidado. Eramos irmãos pelo espirito e pelo coração, e ainda hoje, ao pronunciar seu nome bem amado, eu experimento as caras emoções daquelle tempo, em que juntos vivemos felizes. Foi ainda um pesquisador de largas vistas e de technica irreprehensivel, a quem deve a escola de Oswaldo Cruz valiosa actividade de largos annos e parte apreciavel de seu prestigio. (Chagas, 1928: 4)

Finalmente, transformar e sintetizar são ferramentas amplamente utilizadas. Uma das figuras de seu trabalho mostra que Chagas 'transformou' as imagens microscópicas e os desenhos de Castro Silva, um dos grandes ilustradores dos trabalhos do Instituto de Manguinhos, num esquema mais simples e organizado, para explicar o que ele considerou um processo de transformação do parasita nas células e que hoje conhecemos como a transformação de formas tripomastigotas em amastigotas. Além disso, o resumo de seu trabalho clássico é um primor de capacidade de 'síntese', como pode ser conferido na reprodução neste livro.

Desde 1986, com a Carta de Ottawa, o conceito atualmente adotado pela OMS para a promoção da saúde é "proporcionar aos povos os meios necessários para melhorar sua saúde e exercer um maior controle sobre a mesma". Para isso, além dos conhecimentos, técnicas e métodos de intervenção, prevenção e assistência à saúde, são necessárias ações

de comunicação em saúde e de educação em saúde. Segundo a Organización Panamericana de la Salud (OPS/Unesco, 1993), comunicação em saúde implica estratégias para compartilhar conhecimentos e práticas que possam contribuir para conquista de melhores condições de saúde, que inclui elementos de educação, mobilização da opinião pública e participação social. Educação em saúde se refere a qualquer atividade, relacionada com aprendizagem, desenhada para alcançar saúde (Tones & Tilford, 1994). Chagas nos legou também conselhos sobre estes temas, bem explicitados na conferência no II Congresso Brasileiro de Higiene, sobre os quais devemos refletir e nos inspirar.

> *A educação technica dos funccionarios de saude publicca, e especialmente de medicos hygienistas, é de tóda urgencia e necessidade maxima, porque nella deveremos fundamentar a efficacia maior e melhor organização economica dos serviços sanitarios. (...) Os methodos,* até agora usados, nos serviços de Prophylaxia Rural, devem experimentar *modificação evolutiva.* De inicio, para *convencer e educar,* e para attender a falhas de assistencia medica, inexistente em nossos sertões, foi mistér mais *considerar a doença para cural-a, do que cuidar a saude, para conserval-a.* Devemos agora, *sinão inverter o methodo, pratical-o com o mesmo esforço nas suas duas modalidades.* E tanto importa indicar a urgencia de se transformarem em permanentes, para que sejam nelles considerados todos os problemas de saude publica, os postos actuaes de prophylaxia rural. (Chagas, 1928: 3 – grifos nossos)

A casa de Carlos Chagas – os institutos que se agregam na Fundação Oswaldo Cruz – e, em particular, o Instituto Oswaldo Cruz aqui representado pelos três laboratórios das autoras, busca seguir ao pé da letra seus conselhos. Nas pesquisas em curso nos esforçamos por caminhar, observar e registrar, com objetivo, reconhecendo e prestando atenção no outro ser humano que está conosco, seja paciente, aluno, mestre ou colaborador. Buscamos caminhar juntos, acolher, confiar, improvisar, exercitar a criatividade, identificar as representações e pensamentos dos que estão conosco, perceber isolamentos, construir parcerias, expressar imagens e desejos, resgatar confiança e auto-estima, articular o pensamento, sensibilizar e vivenciar nossos personagens: cientista, artista, povo, profissional de saúde, gerando alegria. Para as novas gerações de cientistas e profissionais da saúde, honrar o legado de Carlos Chagas é se engajar na formação de profissionais que fazem ciência para a saúde da população brasileira.

REFERÊNCIAS

AUFDERHEIDE, A. C. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101: 2.034-2.039, 2004.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas' disease chemotherapy: value and limitations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, no prelo.

CHAGAS, C. R. J. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 1: 159-218, 1909. Disponível em: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/pdf/Tomo01/tomo01(f2)_159-218.pdf>.

CHAGAS, C. Molestia de Carlos Chagas: Conferencia realizada em 7 de agosto na Academia Nacional de Medicina. *Brasil Médico*, 25: 340-343, 1911. Disponível em: <http://carloschagas.ibict.br>.

CHAGAS, C. Discurso proferido na sessão inaugural do Segundo Congresso Brasileiro de Hygiene, no Theatro Municipal, Bello Horizonte, em 1º de dezembro de 1924. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE HYGIENE, 2, Belo Horizonte. *Anais*... Rio de Janeiro: Pimenta de Mello, 1928. v. 1. Disponível em: <http://carloschagas.ibict.br>.

CHAGAS, E. Summula dos conhecimentos actuaes sobre a Trypanosomiasis americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 30(3): 387-416, 1935. Disponível em: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/pdf/Tomo30/tomo30(f3)_387-416.pdf>.

CHAGAS FILHO, C. *Meu Pai*. Rio de Janeiro: Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz, 1993.

CHAGAS FILHO, C. Cenas da vida de Carlos Chagas. *Ciência e Cultura*, 31(7), supl.: 5-14, 1979.

COURA, J. R. Chagas' disease: what is known and what is needed - a background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 113-122, 2007.

COURA, J. R. & DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 3-24, 2002.

DIAS, J. C. Southern Cone initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas' disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 11-8, 2007.

HIGUCHI M. L. *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research*, 60:96-107, 2003

HOTEZ, P. J. *et al.* Combating tropical infectious diseases: report of the disease control priorities in developing countries project. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 871-878, 2004.

HOTEZ, P. J. *et al.* The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(9): e300, 2008.

LANNES-VIEIRA, J. *et al.* Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the genesis to the proposal of rational therapeutic interventions targeting at cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, no prelo.

LIMA, V. S. *et al.* Chagas' disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. *Infectious Diseases*, 14: 1.001-1.002, 2008.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas' heart disease. *Circulation*, 115: 1.109-1.123, 2007.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* BENEFIT Investigators: rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT). *American Heart Journal*, 156: 37-43, 2008.

OLIVEIRA JR., W. Atenção integral ao paciente chagásico: uma proposta para o cuidar. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 84(1): 1-2, 2005.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS)/UNESCO. *Por una Política de Comunicación para la Promoción de la Salud en América Latina*. Quito: OPS/Unesco, 1993.

POLONIO, R.; RAMIREZ-SIERRA, M. J. & DUMONTEIL, E. Dynamics and distribution of house infestation by *Triatoma dimidiata* in Central and Southern. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 9: 19-24, 2008

RAMSEY, J. M. & SCHOFIELD, C. J. Control of Chagas' disease vectors. *Salud Pública de México*, 45: 123-128, 2003.

REMME, J. H. F. *et al.* Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends in Parasitology*, 18: 421-426, 2002.

ROOT-BERNSTEIN, R. & ROOT-BERNSTEIN, M. *Centelhas de Gênios*. São Paulo: Nobel, 2000.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas' disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 75-85, 2007.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J. & SALVATELLA, R. The future of Chagas' disease control. *Trends in Parasitology*, 22: 583-588, 2006.

SOEIRO, M. N. & DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13: 105-121, 2009.

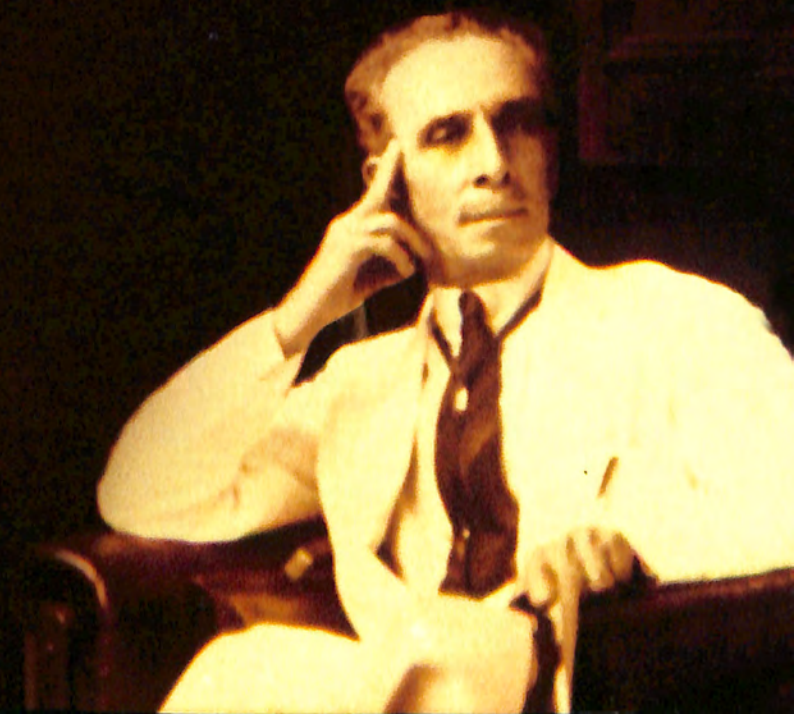
TÉLLEZ-MENESES, J.; MEJÍA-JARAMILLO, A. M. & TRIANA-CHÁVEZ, O. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from domestic and sylvatic vectors in Sierra Nevada of Santa Marta, Colombia. *Acta Tropica*, 108: 26-34, 2008.

TONES, K. & TILFORD, S. *Health Education: effectiveness, efficiency and equity*. London: Chapman & Hall, 1994.

VIOTTI, R. *et al*. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas' disease with benznidazole *versus* no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 144: 724-734, 2006.

VIOTTI, R. *et al*. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas' disease: fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7: 157-163, 2009.

YAMEY, G. The world's most neglected diseases. *BMJ*, 325: 176-177, 2002.

Clássicos & Comentários

Carlos Chagas

Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum n. gen., n. sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1: 159-218, 1909.

Carlos Chagas (1878-1934)

Médico nascido em Minas Gerais, descobriu a tripanossomíase americana – doença de Chagas. A descoberta, que incluiu ainda a identificação do agente causal, o protozoário que denominou de *Trypanosoma cruzi*, e do seu vetor, conhecido como barbeiro, constitui um marco na história da ciência e da saúde brasileiras.

Nova tripanozomiaze humana.

Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem

pelo

Dr. Carlos Chagas,

Assistente.

(Estampas 9 a 13 e 10 figuras no texto)

Ueber eine neue Trypanosomiasis des Menschen.

Studien über Morphologie und Entwicklungszyklus des *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, Erreger einer neuen Krankheit des Menschen

von

Dr. Carlos Chagas,

Assistenten.

(Mit Tafeln 9—13 und 10 Textfiguren)

Introdução.

Em 1907 fomos incumbido pelo diretor Dr. OSWALDO GONÇALVES CRUZ, de executar a campanha anti-paludica nos serviços de construção da Estrada de Ferro Central do Brazil, na rejião norte do Estado de Minas Geraes. Tivemos informações da existencia ali do hematofago, denominado *barbeiro* pelos naturais da zona, que habita os domicilios humanos, atacando o homem á noite, depois de apagadas as luzes, ocultando-se, durante o dia, nas frestas das paredes, nas coberturas das cazas, em todos os esconderijos, emfim, onde possa encontrar guarida. De regra, é o hematofago visto em maior abundancia nas habitações pobres, nas choupanas de paredes não rebocadas e cobertas de capim. Ali a reprodução delle é consideravel; são encontrados em numero imenso nas frestas das paredes e constituem condição anti-vital das mais notaveis, pela dificuldade trazida ao repouzo do homem. Muita vez verificámos o ataque do homem pelo hematofago: Poucos minutos apoz a extinção da luz nos apo-

Einleitung.

Im Jahre 1907 wurde ich von Dr. OSWALDO GONÇALVES CRUZ, Leiter des Institutes von *Manguinhos* beauftragt, die Bekämpfung der Malaria bei der Konstruktion der brasilianischen Zentralbahn im Norden des Staates *Minas Geraes* zu organisieren. Daselbst hörte ich von dem Vorkommen eines gefürchteten blutsaugenden Insektes, das bei den Einwohnern als *Barbier (Barbeiro)* bekannt ist. Dasselbe lebt in den menschlichen Wohnungen, woselbst es nachts, nach Löschen der Lichter, die Bewohner angreift, während es bei Tage sich in den Spalten der Wände, in den Zimmerdecken und wo es sonst eine sichere Zuflucht findet, versteckt hält. In der Regel wird dieser Blutsauger in grösster Menge in den Wohnungen armer Leute gefunden, welche nicht getüncht und nur mit Gras gedeckt sind. Hier vermehrt derselbe sich so sehr, dass er in ungeheurer Menge auftritt und durch die Störung des Schlafes eine höchst ungünstige Wirkung ausübt. Ich war oftmals Zeuge der Angriffe dieser Blutsauger, welche in den

zentos saem elles dos esconderijos, em grande numero, e vêm picar os individuos, de preferencia no rosto. Acendendo-se o lume os hematofagos fojem rapidamente, sendo mesmo dificil, deste modo, a captura delles.

O hematofago só permanece nas habitações emquanto aí rezide o homem; das cabanas abandonadas bem depressa elle dezaparece, certo pelo fato de auzencia de alimentação.

Entre os naturais é crença geral que o hematofago é inseto silvestre, vindo á noite, para o interior das cazas, onde se domicilia e se reproduz. Si assim é, não o sabemos, porquanto, nunca nos foi dado verificar aquelle fato e tambem porque nunca encontrámos o inseto fóra de habitações humanas.

E' o hematofago referido um hemiptero heteroptero, da familia *Reduviidae,* genero *Conorhinus.* A especie é, provavelmente, *megistus* BURM. (Est. 9). O estudo do inseto, especialmente a biolojia delle, vai sendo feito na seção de zoolojia do Instituto, pelo Dr. ARTHUR NEIVA, que do assunto, quando oportuno, dará conhecimento exato.

Examinando o conteúdo do intestino posterior de exemplares de conorrinos, colhidos em Minas Geraes, no interior de habitações humanas, verificámos ali a prezença de numerozos flajelados com os carateres morfolojicos de critidias. Enviámos, então, hematofagos para o Instituto e, aí, o nosso diretor, Dr. OSWALDO CRUZ, tentou infetar um macaco da especie *Callithrix penicillata,* fazendo-o picar por diversos exemplares do hemiptero. Decorridos 20 ou 30 dias, apoz a picada, foram encontrados no sangue periferico daquelle macaco tripanozômos em grande numero, de morfolojia inteiramente diversa da de qualquer das especies conhecidas do genero *Trypanosoma.*

Iniciámos, então, o estudo do flajelado, conseguindo, desde logo, infetar por inoculação diversos animais de laboratorio, cobaias, cães, coelhos e outros macacos.

O parazito mostra-se patojenico para todos esses animais, mais para os *Callithrix* e para as cobaias e muito menos para os cães que,

Wohnräumen wenige Minuten nach Auslöschen der Lichter in grosser Zahl aus ihren Schlupfwinkeln hervorkommen und die Bewohner mit Vorliebe im Gesicht stechen. Wenn man dann das Licht anzündet, so fliehen diese Schmarotzer mit grösster Geschwindigkeit, so dass es schwer hält, sie bei dieser Gelegenheit zu fangen.

In den Wohnungen verbleiben diese Tiere nur so lange, als der Mensch sie benützt; aus verlassenen Hütten verschwinden dieselben sehr bald, wohl sicher in Folge mangelnder Nahrung.

Unter den dortigen Einwohnern herrscht allgemein die Ansicht, dass das blutsaugende Insekt ursprünglich im Walde lebt und nachts, vom Lichte angezogen, ins Innere der Häuser dringt, wo es sich niederlässt und weiter vermehrt. Ich bezweifle, dass es sich so verhält, da ich dieses Faktum nie beobachten konnte und das Insekt niemals ausserhalb menschlicher Wohnungen antraf.

Der erwähnte blutsaugende Schmarotzer gehört zu den *Hemiptera heteroptera,* zur Familie *Reduviidæ* und in das Genus *Conorhinus* (Tafel 9). Die Species ist wahrscheinlich *megistus* BURM. Das Studium dieser Insekten und insbesondere ihrer Biologie wird in der zoologischen Abteilung des Institutes von Dr. ARTHUR NEIVA ausgeführt, der darüber zu gelegener Zeit eingehend berichten wird.

Bei der Untersuchung des Hinterdarmes von *Conorhinus*wanzen, welche im Staate *Minas Geraes* im Innern menschlicher Wohnungen gesammelt waren, konstatierte ich zahlreiche Flagellaten mit den morphologischen Charakteren der *Crithidien.* Ich sandte darauf solche Wanzen an das Institut, woselbst unser Direktor, Dr. OSWALDO CRUZ, einen kleinen Affen der Species *Callithrix penicillata* zu infizieren suchte, indem er denselben von verschiedenen Exemplaren dieser Wanzenart stechen liess. 20—30 Tage nach der Application wurden im peripherischen Blute dieses Affen zahlreiche Trypanosomiden gefunden, die sich morphologisch deutlich von den anderen Arten des Genus *Trypanosoma* unterschieden.

Ich begann hierauf das Studium dieser Flagellatenart, wobei es mir gleich anfangs

quando adultos, sobrevivem longamente á infeção. O *Callithrix* e as cobaias morrem em tempo variavel, geralmente com menos de 1 mez; a cobaia em pouco mais que o *Callithrix;* o mesmo acontece ao cão novo.

Dos animais experimentados, o mais sensivel parece ser o *Callithrix*. Neste a infeção é sempre mais abundante do que nos outros animais e a ação patojenica tambem mais acentuada. Durante todo o evoluir da molestia, no *Callithrix*, como nos outros animais de laboratorio, os parazitos são vistos no sangue periferico, havendo fazes nas quais aumenta de modo sensivel o numero de flajelados, o que parece indicar multiplicação periodica.

Já em nota anterior publicada nos «Arch. für Schiffs- und Tropenhygiene» fizemos referencia ao tripanozómida que estudamos, em sua evolução no conorrino e nos animais por elle infetados, tendo denominado, nesse comunicado, o parazito *Trypanosoma cruzi*. O modo de evolver todo particular deste protozoario, como se verá no correr deste trabalho, pareceu-nos poder justificar a creação, para elle, de novo genero, o que fizemos, passando por isto a denominal-o *Schizotrypanum cruzi*.

Depois de haver estudado o duplo ciclo evolutivo do flajelado nos animais de laboratorio e no inseto transmissor e ignorando qual fosse o hospedeiro habitual do parazito, quizemos realizar novas pesquizas na zona onde haviamos encontrado os *conorhini* infetados, no intuito de esclarecer, si possivel, aquella incognita. Foi de grande exito nesse ponto, o rezultado a que chegámos, visto termos verificado ser o flajelado parazito do homem, ajente etiolojico de entidade morbida bem caraterizada. Nem o fato foi, para nós, grande surpreza, porquanto, considerando os habitos do hematofago, que só habita os domicilios humanos, e nutre-se, de preferencia, de sangue do homem, era bem de admitir, de acordo ainda com a teoria filojenetica dos hemo-flajelados, pudesse o parazito em questão infetar a especie humana. E foi raciocinando deste modo que empreendemos exames de sangue

gelang, dieselbe durch Impfung auf verschiedene Laboratoriumstiere, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde und andere Affen zu übertragen. Der Parasit erwies sich für alle diese Tiere als pathogen, am meisten für Callithrix-affen und Meerschweinchen und viel weniger für den Hund, der, wenn erwachsen, die Infektion lange überlebt. Erstere Tiere sterben nach verschiedenen Zeiträumen, Meerschweinchen gewöhnlich vor Ablauf eines Monats und die Pinseläffchen wenig später; dasselbe beobachtet man bei jungen Hunden.

Von den Versuchstieren scheint die *Callithrix* am meisten empfindlich. Bei dieser ist die Infektion immer reichlicher und die pathogene Wirkung mehr ausgesprochen, als bei anderen Tieren. Während des ganzen Verlaufes der Krankheit aller dieser Versuchstiere erscheinen die Parasiten im peripheren Blute, indem die Zahl der Flagellaten zeitweise deutlich zunimmt, was eine periodische Vermehrung anzudeuten scheint. Ueber die Entwicklung der Trypanosomide in der Wanze und den damit infizierten Tieren habe ich im «Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene» schon vorläufig berichtet und sie «*Trypanosoma cruzi*» genannt. Die eigentümliche Entwicklung, über die ich in der vorliegenden Arbeit ausführlicher berichten werde, lässt es jedoch gerechtfertigt erscheinen, eine neue Gattung dafür aufzustellen, weshalb ich sie jetzt «*Schizotrypanum cruzi*» nenne.

Nachdem ich den doppelten Entwicklungsgang dieses Flagellaten im Versuchstiere und im übertragenden Insekte studiert hatte, ohne den gewöhnlichen Wirt zu kennen, wollte ich auch in der Zone, in welcher ich die infizierten *Conorhinus* angetroffen hatte, Untersuchungen anstellen, um, womöglich, auch dieses Problem aufzuklären. Das erhaltene Resultat erwies sich als von grosser Tragweite, da ich feststellen konnte, dass dieser Flagellat ein menschlicher Parasit und die Ursache eines eigenartigen und gut characterisierten Krankheitszustandes ist. Uebrigens war diese Tatsache für mich nicht sehr überraschend; in Anbetracht der Gewohnheiten des Parasiten, welcher nur in Wohnungen lebt und sich mit Vorliebe von menschlichem Blute ernährt,

sistematicos nos individuos domiciliados nas cazas onde encontrámos *barbeiros;* procedemos ainda nelles a pesquizas semeioticas demoradas, afim de verificar a existencia de elementos morbidos carateristicos de tripanozomiazes. Examinámos, tambem, o sangue de animais domesticos que pernoitavam nas habitações humanas. Desde logo verificámos a existencia de tripanozómida no sangue periferico do gato.

Infeção do homem.

A historia clinica da nova especie morbida humana é ainda muito deficente, porquanto não nos foi dado acompanhar longamente doentes, estudando nelles, com a sequencia dezejavel, a sintomatolojia completa. Pouco sabemos do prognostico e das relações necessarias entre o evolver da especie morbida e o ciclo do ajente etiolojico, fatos de grande monta que vão depressa ocupar nossas pesquizas e dos quais procuraremos dar, oportunamente, minuciozo conhecimento.

No homem o que primeiro impressionou nossa atenção foi a existencia de conjunto de sintomas frequentes e uniformes, mais salientes nas creanças, sintomas que, desde logo se impunham a nosso raciocinio clinico como expressivos de entidade morbida autonoma. Eram delles os mais apreciaveis os seguintes:

Anemia profunda, com grande decadencia organica e, em muitas creanças, sensivel retardamento da evolução, e, nos adultos, infantilismo bem caraterizado; edemas, generalizados em alguns doentes, em outros, limitados a certas zonas; enfartamento ganglionar em todas as pleiades perifericas, podendo ser apreciados volumozos ganglios cervicais, axilares, crurais e inguinais; esplenomegalia, ás vezes consideravel, muito constante, sem que podesse ser atribuivel á infeção pelo impaludismo; hepatomegalia menos frequente; perturbações funcionais diversas, especialmente para o sistema nervozo, sendo de impressionar a condição inteletual precaria de muitas creanças, havendo, mesmo, muitos cazos de verdadeira imbecilidade.

konnte man — auch im Einklange mit der Theorie der phylogenetischen Entwicklung der Hämoflagellaten — annehmen, dass der fragliche Parasit den Menschen infizieren könnte. Von diesen Gedanken geleitet, unternahm ich eine systematische Blutuntersuchung bei den Bewohnern der Häuser, in welchen die «Barbeiros» gefunden wurden; zugleich nahm ich semeiotische Untersuchungen vor, um das Vorhandensein krankhafter Erscheinungen festzustellen, welche zur Kennzeichnung einer Trypanosomiasis dienen könnten. Ich untersuchte auch das Blut derjenigen Haustiere, welche in den menschlichen Wohnungen übernachteten, wobei ich gleich anfangs das Vorkommen des Trypanosoma im peripherischen Blute einer Katze konstatierte.

Die Infektion beim Menschen.

Die klinische Geschichte der neuen menschlichen Krankheitsart ist noch ungenügend, da ich nicht Gelegenheit hatte, einen Patienten längere Zeit zu beobachten und die ganze Symptomatologie mit wünschenswerter Genauigkeit zu verfolgen. Ueber die Prognose und die notwendigen Beziehungen zwischen dem Verlaufe des Krankheitsprozesses und dem Entwicklungszyklus des Erregers ist noch wenig bekannt; diese wichtigen Verhältnisse werden demnächst meine Aufmerksamkeit beschäftigen und ich hoffe, später darüber ausführlicher zu berichten.

Was beim Menschen zuerst meine Aufmerksamkeit erregte, war das Bestehen eines Komplexes von häufigen und übereinstimmenden Symptomen, welche bei Kindern auffallender waren; sie erschienen bei der klinischen Beobachtung sofort als Ausdruck einer selbständigen Krankheitseinheit. Am deutlichsten waren die folgenden zu erkennen: Hochgradige Anämie mit starkem organischen Verfall und eine im Verhältnis zum Alter auffällige Verspätung der Entwicklung mit ausgesprochenem Infantilismus; Oedeme, die bei einigen Patienten generalisiert, bei anderen auf gewisse Zonen beschränkt waren; Lymphdrüsenschwellungen, die an allen peripheren Gruppen zum Ausdruck kam, so dass ich grosse Nacken-, Achsel-, Schenkel- und Leistendrüsen beobach-

De informações cuidadozamente colhidas deduzimos ser muito grande a letalidade de creanças na zona. Referem os naturais como muito frequentes as convulsões infantis, em diversas idades, atribuindo áquelle síndrome a maioria de mortes das creanças. Ou assim é, morrem as creanças com predomio de sintomas para o lado do sistema nervozo, ou aprezentam, nos ultimos estádios de molestia fatal, verdadeira hidropizia, comparavel á da anquilostomiaze. E esse ultimo fato dá razão ás duas denominações pelas quais a molestia é conhecida pelos naturais, a de *opilação* e a de *canguary,* nomes dados pelo povo, em outras zonas onde grassa, á anquilostomiaze. Julgámos dever excluir a intervenção desta molestia do quadro morbido observado e para isso, apezar da auzencia de sinais clinicos daquella verminoze, procedémos a muitos exames de fezes, com rezultado negativo, naquelles doentes cujo aspeto morbido referimos.

Foi do modo seguinte que verificámos a infeção do homem pelo flajelado:

Em diversas habitações humanas, onde existiam *barbeiros,* em cujo intestino encontrámos abundantes fórmas de critidias, fizemos uma primeira vez exames de sangue, mais demorados nos doentes com a sintomatolojia referida. Nesta primeira pesquiza, cumpre observar, limitámo-nos a examinar, de cada doente, uma gota de sangue entre lamina e laminula, o que, de alguma fórma, justifica o rezultado negativo a que chegámos. Quatro dias depois, porém, chamado para medicar uma creança em estado grave, creança cujo sangue haviamos tambem examinado, verificámos, em pesquiza no estado vivo, a prezença de flajelados no sangue periferico. Córando preparados de sangue pelo metodo de GIEMSA concluimos ser o flajelado observado tripanozómida, de morfolojia inteiramente identica á do *Schizotrypanum cruzi,* cuja biolojia estudavamos no laboratorio, em animais inicialmente infetados por exemplares de *conorhini,* provenientes da mesma zona onde faziamos as atuais pesquizas.

Imediatamente apoz esta verificação inoculámos duas cobaias e um sagui com sangue

ten konnte; eine sehr konstante und oft beträchtliche Milzschwellung, welche nicht auf Malaria zurückgeführt werden konnte; weniger häufig Leberschwellung; endlich verschiedene funktionelle Störungen, besonders des Nervensystems, wobei namentlich der prekäre Zustand der Intelligenz auffiel, so dass sogar viele Fälle von wirklicher Imbecillität vorkamen.

Aus sorgfältig erhobenen Informationen entnahm ich, dass in der Zone die Kindersterblichkeit eine grosse war, wobei von den Einwohnern Konvulsionen als besonders häufig und auf verschiedenen Altersstufen auftretend angegeben und diesem Symptome die meisten Todesfälle unter den Kindern zugeschrieben wurden. Entweder sterben die Kinder in dieser Weise, unter vorherrschenden Symptomen von Seiten des Nervensystems, oder sie zeigen in den letzten Stadien der tödlichen Erkrankung eine wirkliche Wassersucht, welche mit derjenigen bei Ankylostomiasis vergleichbar ist. Letztere Tatsache rechtfertigt die beiden Benennungen, unter welchen die Krankheit unter den Einwohnern bekannt ist, nämlich «*Opilação*» und «*Canguary*», Namen welche von dem Volke in anderen Zonen, wo dieselbe herrscht, der Ankylostomiasis gegeben werden. Ich glaubte, den Einfluss letzterer Krankheit bei dem beobachteten Krankheitsbilde ausschliessen zu müssen und habe deshalb, ungeachtet des Fehlens klinischer Zeichen dieser Wurmkrankheit, bei Kranken mit den geschilderten Erscheinungen zahlreiche Fäkaluntersuchungen vorgenommen, welche ein negatives Resultat ergaben.

Die Infektion des Menschen durch den Flagellaten wurde von mir in folgender Weise festgestellt:

In verschiedenen menschlichen Wohnungen, wo «Barbeiros» vorkamen, in deren Darme ich reichlich *Crithidien*-formen gefunden hatte, machte ich eine erstmalige Blutuntersuchung, welche bei Patienten mit der oben angeführten Symptomatologie besonders eingehend war. Bei dieser ersten Untersuchung wurde, wie hier bemerkt sei, von jedem Patienten nur ein Blutstropfen im feuchten Deckglaspräparat untersucht, was das negative Resultat, zu dem ich gelangte, einigermassen

retirado, por punção venoza, da creança. As cobaias morreram no 6.º dia apoz a inoculação e no pulmão de ambas encontrámos fórmas parazitarias, inteiramente identicas ás que temos estudado no ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi.* O *Callithrix,* 8 dias depois da inoculação aprezentou na circulação periferica flajelados de morfolojia identica a do tripanozómida estudado.

Outro rezultado pozitivo foi obtido quazi simultaneamente, por inoculação do sangue de creança de 2 anos em duas cobaias. Tratava-se de doente muito anemiado, com volumozos ganglios axilares, cervicais e inguinais, esplenomegalia, edema sub-palpebral, decadencia organica acentuada. Este doente era frequentes vezes acometido de acessos febris. Em exame de gotas de sangue periferico, entre lamina e laminula, assim como em exame do material retirado dos ganglios, nada obtivemos, pelo que dado o aspeto clinico caracteristico do doente, rezolvémos tentar a inoculação de animais sensiveis. As duas cobaias morreram, uma dellas no 2.º dia, sem que podessemos verificar a prezença de parazitos, parecendo ter sido acidental a morte; a outra cobaia, porém, morreu no 9.º dia apoz a inoculação e no pulmão desta verificámos grande abundancia de fórmas parazitarias inteiramente identicas ás das cobaias da experiencia anterior. Não encontrámos no sangue periferico desta cobaia, em exame rapido, flajelados, o que significa o estado inicial da infeção e a pequena quantidade de material pesquizado.

Terceiro rezultado pozitivo foi-nos fornecido ainda por inoculação em cobaia. Tratava-se de creança de 6 anos, em condição morbida intensa, espressando-se em profunda anemia, edemas generalizados, perturbações funcionais do sistema nervozo. Ao exame fizico encontrámos grandes ganglios cervicais e axilares. O exame do sangue, em epoca de apirexia, exame de gota entre lamina e laminula, foi de rezultado negativo, pelo que inoculámos cobaia. Esta, 20 dias depois, aprezentava flajelados na circulação periferica e 2 mezes depois era intensa a infeção, tendo sobrevivido até agora o animal.

rechtfertigt. Als ich jedoch nach vier Tagen zur Behandlung eines schwer kranken Kindes gerufen wurde, dessen Blut ich schon zuvor untersucht hatte, konstatierte ich die Gegenwart lebender Flagellaten im peripheren Blute. In nach GIEMSA gefärbten Blutausstrichen erkannte ich in dem Flagellaten ein Trypanosoma, das morphologisch gänzlich übereinstimmte mit dem *Schizotrypanum cruzi,* dessen Biologie ich im Laboratorium studiert hatte und zwar an Tieren, welche ursprünglich durch *Conorhinus*-exemplare infiziert worden waren, die aus der Zone stammten, in welcher wir zur Zeit unsere Untersuchungen machten.

Nach diesem Befunde impfte ich sofort zwei Meerschweinchen und ein *Callithrix*-äffchen mit durch Venenpunktion entnommenem Blute des Kindes. Die Meerschweinchen starben am sechsten Tage nach der Impfung und in den Lungen beider wurden parasitäre Formen gefunden, welche mit den, im Entwicklungsstadium von *Schizotrypanum cruzi* studierten, vollkommen übereinstimmten. Die *Callithrix* zeigte acht Tage nach der Impfung im peripherischen Blutkreislaufe Flagellaten mit denselben Formen, wie die der studierten Trypanosomide.

Ein anderes positives Resultat wurde fast gleichzeitig erzielt, indem das Blut eines acht Jahre alten Kindes zwei Meerschweinchen eingeimpft wurde. Es handelte sich um einen Patienten mit starker Anämie, voluminösen Axillar-, Cervical- und Inguinaldrüsen, Milzschwellung, Oedem der Augenlider und ausgesprochenem organischen Verfall. Er litt auch an häufigen Fieberanfällen. Bei der Untersuchung von Tropfen des peripherischen Blutes im feuchten Präparate und ebenso bei einer solchen von Lymphdrüsenmaterial fand ich nichts, weshalb ich, im Hinblick auf das charakteristische klinische Bild des Patienten beschloss, die Uebertragung auf sensible Tiere zu versuchen. Beide Meerschweinchen starben, eines davon am zweiten Tage, ohne dass ich das Vorhandensein von Parasiten konstatieren konnte, während der Tod zufällig erfolgt zu sein schien; das andere Meerschweinchen starb dagegen am neunten Tage nach der Einimpfung und in den Lungen desselben fand

Convém afirmar a absoluta impossibilidade de infeção acidental dos animais em experiencia, os quais se achavam continuamente em gaiola de téla fina, ao abrigo de picadas de qualquer hematofago. E por outro lado, estando estes rezultados inteiramente de acordo com experiencias de laboratorio que obedeceram ao maior rigor de tecnica, izentas de qualquer cauza de erro, foram elles decizivos, dando marjem, desde logo, a concluzões definitivas.

O flajelado obtido no *Callithrix* por inoculação de sangue humano parazitado acha-se no laboratorio e tem servido para a continuação de novas pesquizas. Os *Callithrix* morrem um mez e meio apoz a inoculação com flajelados no sangue periferico e fórmas parazitarias no pulmão, identicas ás da scobaias.

Vamos referir a historia clinica dos dois doentes, em cujo sangue verificámos a prezença do *Schizotrypanum cruzi*.

I. BERENICE, de côr branca, 2 anos de idade, brazileira, nacida na mesma zona onde se encontra. A anamnese ensina: Auzencia completa de fenomenos morbidos até a prezente molestia, cujo inicio é referido á 4 mezes antes. As primeiras manifestações morbidas constaram de acessos febris intensos intermitentes, entrando a creança, desde essa ocazião, em franca decadencia organica. Depois dos primeiros ataques de reação febril a doente tinha periodos longos de apirexia, interrompidos de acessos febris de pouca duração. Não foram referidas perturbações funcionais do sistema nervozo.

Condição morbida atual: Palidez consideravel, aspeto *bouffu,* edema sub-palpebral constante e edemas fugazes na testa e membros. No primeiro exame, quando auzentes parazitos do sangue periferico, a doente achava-se apiretica; quatro dias depois, porém, quando encontrámos flajelados, a creança tornou-se febril, atinjindo a temperatura 40°, no primeiro acesso; a este seguiram-se tres outros nos dias consecutivos, começando a elevação de temperatura depois de meio dia e prolongando-se pela noite. Havia, nas primeiras horas do dia, algumas horas de apirexia.

ich eine grosse Anzahl parasitärer Formen, welche mit denjenigen des Meerschweinchens im obigen Versuche vollständig übereinstimmten. Bei einer kurzen Untersuchung fand ich im peripheren Blute dieses Meerschweinchens keine Flagellaten, was auf das Anfangsstadium der Infektion und geringe Menge des untersuchten Materials deutet.

Ich erhielt noch ein drittes positives Resultat durch die Impfung eines Meerschweinchens. Es handelte sich um ein sechsjähriges Kind in ausgesprochenem Krankheitszustande; derselbe äusserte sich in starker Anämie, generalisierten Oedemen und funktionellen Störungen von Seite des Nervensystems. Bei der Untersuchung konstatierte ich grosse Cervical- und Axillardrüsen. Die einmalige Untersuchung eines Blutstropfens unter dem Deckglase, welche während der Apyrexie vorgenommen wurde, ergab nichts, weshalb ein Meerschweinchen geimpft wurde. Dieses zeigte zwanzig Tage später Flagellaten in der peripherischen Zirkulation und zwei Monate darauf war die Infektion eine sehr lebhafte; doch ist das Tier bisher am Leben geblieben.

Es ist hier auch am Platze, die absolute Unmöglichkeit einer zufälligen Infektion der Versuchstiere anzuführen, welche sich, vor Stichen geschützt, in Käfigen von feiner Drahtgaze befanden.

Diese Ergebnisse stehen nun völlig im Einklange mit Laboratoriumsexperimenten, welche mit sorgfältigster Technik ausgeführt wurden und frei von jeder Fehlerquelle sind; so waren sie entscheidend und gestatteten ohne weiteres bestimmte Schlüsse.

Die Flagellaten, welche bei der *Callithrix* durch Einspritzung parasitenhaltigen menschlichen Blutes erhalten wurden, werden stets im Laboratorium gezüchtet und haben zur Fortsetzung neuer Versuche gedient. Der Affe starb 1½ Monate nach der Inokulation, mit Flagellaten im peripheren Blute und Parasitenformen in den Lungen, welche mit denjenigen der Meerschweinchen übereinstimmten.

Ich gebe hier die klinische Geschichte der beiden Patienten, in deren Blute ich das Vorhandensein von *Schizotrypanum cruzi* konstatierte.

Exame fizico: Grande numero de ganglios cervicais, alguns bem volumozos, nas rejiões sub-maxilar, esterno cleido-mastoidea e na infra-clavicular. Diversos ganglios volumozos nas rejiões axilares, inguinais e crurais. Baço crecido, estando perceptivel, pela apalpação, sob a arcada costal. Area de matidez esplenica muito aumentada. Certo gráu de esplenaljia. Hepatomegalia. O figado está aumentado para cima e para baixo. Dôr á pressão do orgão, abaixo do rebordo costal e tambem no epigastrio. Aparelho urinario: Leves vestijios de albumina na urina. Micçõis normais. Sistema nervozo: Grande ajitação e delirio nos periodos de maxima elevação termica.

Sangue: Dia 14-4-09 — Tripanozómidas no sangue periferico, em numero não muito grande, sendo vistos de 15 a 20 em gota, entre lamina e laminula.

Dia 17-4-09 — A doente esteve febril durante a noite; tripanozómidas no sangue periferico, em numero sensivelmente menor que no exame anterior.

Dia 23-4-09 — A doente achava-se apiretica, desde 2 dias; tripanozómidas em menor numero, sendo com dificuldade verificaveis nos preparados vivos. Foi esta a ultima pesquiza que nos foi dado fazer nesta doente.

II. José, de 8 anos, côr preta, nacido na zona. A anamnese refere: Estado morbido desde 2 anos, espressando-se em grande fraqueza geral, edemas mais ou menos demorados na face e membros inferiores, acessos febris periodicos. Estado atual: Esteve febril 8 dias antes do nosso exame e no momento achava-se apiretico, notando-se, porém, salientes, os seguintes sintomas morbidos: edema palpebral, grande palidez com aspeto *bouffu*, ganglios cervicais, axilares e inguino-crurais engurjitados. Esplenomegalia acentuada e tambem hepatomegalia. Auzencia de perturbações funcionais do sistema nervozo.

Sangue: Dia 14-4-09 — Exame de preparado vivo, entre lamina e laminula, negativo; assim o exame de material retirado pela punção ganglionar.

I. Berenice, zweijährige, weisse Brasilianerin, am Orte der Untersuchung geboren. Die Anamnese ergiebt ein vollständiges Fehlen von Krankheitserscheinungen bis zum Beginne der gegenwärtigen Affektion, welche auf vier Monate früher angegeben wird. Die ersten Krankheitserscheinungen bestanden in sehr heftigen intermittierenden Fieberanfällen, wobei sich an der Kranken von dieser Zeit an ein deutlicher organischer Verfall zeigte. Nach den ersten Fieberanfällen hatte die Patientin längere Perioden von Apyrexie, die von kurz dauernden febrilen Accessen unterbrochen wurden. Funktionelle Störungen von Seite des Nervensystems wurden nicht angegeben.

Gegenwärtiger Krankheitsbefund: Bedeutende Blässe, gedunsenes Aussehen, beständiges Oedem der Augenlider und flüchtige Oedeme an Stirne und Extremitäten. Bei der ersten Untersuchung, als die Parasiten im peripheren Blute fehlten, war sie apyretisch; vier Tage darauf jedoch, als wir die Parasiten in demselben fanden, wurde das Kind fieberisch, wobei die Temperatur im ersten Anfalle 40 Grad erreichte; auf diesen folgten in den nächsten Tagen drei andere Accesse, bei welchen die Temperatursteigerung nach der Mittagsstunde eintrat und sich bis in die Nacht verlängerte. Zu Anfang des Tages gab es einige fieberfreie Stunden.

Untersuchung der Kranken: Grosse Anzahl von, zum Teil voluminösen, Drüsen am Halse, in den Submaxillar-, Sterno-cledomastoideal- und Supraclaviculargegenden. Verschiedene beträchtliche Drüsenschwellungen in den Axillar-, Inguinal- und Cruralregionen. Milz vergrössert, unter dem Rippenbogen der Palpation zugänglich; die Dämpfung deutlich erweitert, auch ein gewisser Grad von Splenalgie ist vorhanden. Leber vergrössert und zwar sowohl nach oben, wie nach unten. Beim Druck auf dieselbe unter dem Rippenbogen und im Epigastrium wird Schmerz empfunden.

Harnapparat: Leichte Spuren von Albumin im Urin. Mictionen normal.

Nervensystem: Grosse Aufregung und Delirien während der Perioden höchster Temperatursteigerung.

Blut: 14-IV-09. Trypanosomen im peri-

Dia 17-4-09 — Negativo o exame de gota entre lamina e laminula. Inoculadas nesse dia 2 cobaias com sangue obtido por punção venoza, morreram 12 dias depois e aprezentaram no pulmão grande numero de fórmas esquizogonicas. Este doente, como a precedente, continua sob observação clinica.

III. JOAQUINA, de 6 annos, do sexo feminino, côr parda. Doente desde 6 mezes com acessos febris irregulares. Grande decadencia organica. Edema generalizado mais acentuado no rosto e nos membros inferiores. Ganglios do pescoço, especialmente os da rejião cleido-mastoidéa, muito volumozos. Baço aumentado e dolorozo á palpação. Insonias repetidas e ajitação noturna.

Sangue: Pesquiza de gota entre lamina e laminula, negativa. Verificação da infeção pela prezença de flajelados em cobaia inoculada.

Morfolojia e evolução do Schizotrypanum cruzi no organismo dos vertebrados.

No sangue periferico dos animais infetados o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta duas fazes distintas de evolução, a de organismos intraglobulares e a de flajelados livres no plasma.

No inicio da infeção, isto é, quando tem logar o aparecimento dos primeiros flajelados no sangue periferico, as fórmas intraglobulares são mais abundantes, sendo nesta faze, ás vezes, as unicas encontradas na circulação periférica. O aspeto dos tripanozómidas intra-globulares é variavel: ora se acham elles inteiramente incluidos no globulo vermelho, de modos diversos, formando ás vezes circulo, ou colocados transversalmente, ora têm parte incluida na hemátia e outra livre no plasma, ora, finalmente, o que é aspeto muito frequente, são vistos prezos á hemátia só pelo blefaroplasto. A incluzão de tripanozómidas em hemátias, mais abundantes no inicio da infeção é vista em menor numero, em qualquer outra faze da molestia, o que indica ser aquelle fenomeno condição biolojica no ciclo evolutivo do protozoario.

pherischen Blute in nicht sehr grosser Anzahl, indem etwa 15—20 in einem Tropfen zwischen Objectträger und Deckglass gesehen werden.

17-IV-09. Patientin hat während der Nacht Fieber gehabt; Trypanosomen im peripherischen Blute in deutlich geringerer Anzahl, als bei der letzten Untersuchung.

23-IV-09. Die Patientin ist seit zwei Tagen ohne Fieber; Trypanosomen in geringerer Zahl und im frischen Präparate nur mühsam nachzuweisen. Es war dies die letzte Untersuchung, welche ich bei der Kranken machen konnte.

II. JOSÉ, achtjähriger Mulattenjunge, in der Zone geboren.

Die *Anamnese* ergiebt:

Seit zwei Jahren ein krankhafter Zustand, der sich in grosser allgemeiner Schwäche, mehr oder weniger dauernden Oedemen im Gesicht und an den unteren Gliedmassen, sowie in periodischen Fieberanfällen äussert.

Gegenwärtiger Zustand: Acht Tage vor unserer Untersuchung hat er Fieber gehabt, gegenwärtig ist er apyretisch, dagegen treten folgende Krankheitssymptome deutlich hervor: Oedem der Augenlider, grosse Blässe mit gedunsenem Aussehen, angeschwollene Cervical-, Axillar- und Inguinocruraldrüsen. Ausgesprochene Splenomegalie und auch Leberschwellung vorhanden. Funktionelle Störungen von Seite des Nervensystems nicht nachzuweisen.

Blut: 14-IV-09. Untersuchung im frischen Zustande, negativ; ebenso eine solche von durch Drüsenpunktion erhaltenem Material.

17-IV-09. Untersuchung eines Bluttropfens im frischen Präparate negativ. Zwei mit, durch Venenpunktion erhaltenem, Blute geimpfte Meerschweinchen starben nach 12 Tagen und zeigten in den Lungen grosse Mengen von Schizogonieformen. Der Patient bleibt, wie der vorige, in klinischer Beobachtung.

III. JOAQUINA, sechsjähriges Mulattenmädchen. Seit sechs Monaten krank, mit unregelmässigen Fieberanfällen. Starker organischer Verfall. Allgemeine Oedeme, im Gesichte und an den unteren Gliedmassen mehr ausgesprochen. Ganglien des Halses, besonders der Cleido-mastoidealregion, sehr voluminös. Milz geschwollen und auf Druck empfindlich. Wie-

Desde o estádio intra-globular é bem saliente no tripanozómida dualismo morfolojico, permanecendo este em todas as fazes do ciclo evolutivo. Este dimorfismo, que se espressa mesmo nos preparados defeituozamente fixados apóz dessecamento e que melhor se carateriza, de modo exato, quando são os preparados fixados humidos, consta principalmente de diversidade de fórma e de dimensões do blefaroplasto e do nucleo, como será verificado nas descrições seguintes.

Aprezentando o tripanozómida algumas variantes morfolojicas conforme o mamifero infetado pensámos mais conveniente estudar a morfolojia do parazito adulto nos trez principais hospedeiros vertebrados, homem, sagui e cobaias, em seguida descrevendo as diversas fazes do ciclo evolutivo na cobaia e no sagui, principais animais que serviram para nossas experiencias.

Schizotrypanum cruzi no sangue periferico do homem.

Os exames do parazito no sangue de nossa primeira doente só foram feitos com fixação, apoz desecamento, e coloração pelo metodo de GIEMSA, o que ocaziona certa deficiencia nos dados morfolojicos obtidos. Verdade é que temos conhecimento exato da morfolojia do tripanozómida humano inoculado no *Callithrix*, conhecimento fornecido pela fixação a humido e coloração pela hematoxylina ferrea (metodo de ROSENBUSCH) o que vem garantir a verdade de nossa descrição.

No sangue humano observámos dois aspetos morfolojicos bem distintos do tripanozómida:

Uma das fórmas aprezenta grande blefaroplasto ovoide, colocado muito proximo ou exatamente na extremidade posterior do parazito, com o maior diametro transversal. A fixação a seco determina ver-se, de regra, saliencias laterais do blefaroplasto, o qual se aprezenta com aspeto de barra de cromatina transversal, com as partes laterais não cercadas de plasma. E' frequente observar-se, nesta fórma, como apendice do blefaroplasto

derholte Schlaflosigkeit und nächtliche Aufregung.

Blut: Untersuchung eines frischen Präparates negativ. Feststellung der Infektion durch Auffinden von Flagellaten bei einem geimpften Meerschweinchen.

Morphologie und Entwicklung des Schizotrypanum cruzi im Organismus der Wirbeltiere.

Im peripherischen Blute der infizierten Tiere zeigt das *Schizotrypanum cruzi* zwei verschiedene Entwicklungsphasen: diejenige des intraglobulären Organismus und die der im Blutplasma frei vorkommenden Flagellaten. Zum Beginne der Infektion, d. h., wenn die ersten Flagellaten im Blute erscheinen, sind die intraglobulären Formen zahlreicher vorhanden und nicht selten in dieser Phase die einzigen, welche in dem peripheren Blutkreislauf gefunden werden. Ihr Aussehen ist ein wechselndes: bald befinden sie sich im roten Blutkörperchen vollständig eingeschlossen, indem sie manchmal kreisförmig, manchmal transversal gelagert sind, bald haben sie einen Teil im Innern des Blutkörperchens und den andern frei im Plasma oder endlich, was sehr häufig zu sehen ist, sind sie nur durch den Blepharoplasten mit den Hämatien verbunden. Der Einschluss der Trypanosomen in den Blutkörperchen, welcher zu Anfang der Infektion häufiger ist, wird in den anderen Phasen der Krankheit seltener gesehen, was darauf hinweist, dass diese Erscheinung einen biologischen Zustand im Entwicklungszyklus des Protozoons darstellt.

Schon vom intraglobulären Stadium an, zeigt sich beim *Schizotrypanum* sehr deutlich ein morphologischer Dualismus, welcher in allen Entwicklungsphasen weiter besteht. Dieser Dimorphismus, welcher auch in getrockneten und mangelhaft fixierten Präparaten zum Ausdruck kommt und sich genauer und deutlicher kennzeichnet, wenn der Parasit feucht fixiert wird, zeigt sich besonders in der Verschiedenheit von Form und Dimensionen des Kernes und Blepharoplasten, wie man aus den folgenden Beschreibungen ersehen kann.

segundo elemento cromatico, a elle intimamente ligado e que corresponde ao fuzo central e ao rizoplasto bem apreciavel nos preparados fixados humidos. O nucleo principal tem geralmente fórma ovoide ou se aprezenta como longa faixa de cromatina, colocada no sentido lonjitudinal, aspeto este que parece indicar faze atrazada na evolução do nucleo. E' frequente observar-se, no interior do nucleo, corpusculo de cromatina mais intensamente córado e que corresponde ao cariozoma.

A membrana ondulante aprezenta-se com variavel numero de ondulações dependentes, naturalmente, das condições de movimento do parazito no momento da fixação. O flajelo, cuja orijem apreciavel é ou o proprio blefaroplasto ou a o elemento cromatico já citado apenso áquelle, passa de uma para outra extremidade do organismo, geralmente nas imediações do nucleo ou exatamente ao nivel deste e aprezenta porção livre de comprimento variavel, sempre mais curta que na outra fórma que vamos em seguida descrever. A extremidade anterior do parazito é afilada, sendo o flajelo livre acompanhado até certa altura por delgado prolongamento do plasma.

A outra fórma, observada no sangue humano distingue-se da precedente, sobretudo, pelo tamanho e aspeto do blefaroplasto e do nucleo.

Aqui o blefaroplasto é mais ou menos esferico situado na extremidade posterior do organismo e muito menor que a da fórma anterior não aprezentam de regra, pela tecnica uzada, apendice cromatico apreciavel.

O nucleo é tambem esferico, aprezenta a cromatina menos condensada, sendo, ás vezes, possivel observar os elementos constitutivos della separados em diversos cromozomios. Finalmente, nesta fórma o plasma aprezenta largura sensivelmente maior que na fórma anterior.

Observámos ainda, no sangue de nossa doente, um outro aspeto de tripanozómida no qual o blefaroplasto, ao contrario do que acontece no aspeto normal, acha-se muito dis-

Da die Trypanosomiden, je nach der Art des geimpften Säugetieres, einige Formverschiedenheiten zeigen, halte ich es für angebracht, die Morphologie des Parasiten in den drei Hauptwirten Mensch, *Callithrix* und Meerschweinchen zu studieren und hierauf die verschiedenen Entwicklungsphasen im Meerschweinchen und Pinseläffchen zu beschreiben, da diese Tiere hauptsächlich zu meinen Versuchen dienten.

Das Schizotrypanum cruzi im peripherischen Blute des Menschen.

Die Untersuchung des Parasiten im Blute unserer ersten Kranken wurden mit getrockneten, fixierten und nach GIEMSA gefärbten Präparaten gemacht, was eine gewisse Mangelhaftigkeit der erhaltenen morphologischen Befunde erklärt. Allerdings kannte ich die Morphologie des menschlichen Parasiten genau, da ich sie an den geimpften Aeffchen studiert hatte, wobei feuchte Fixation und Färbung mit Eisenhämatoxylin (Methode von ROSENBUSCH) zur Anwendung kam, was die Richtigkeit unserer Beschreibung garantiert. Im menschlichen Blute beobachtete ich zwei deutlich verschiedene Formen des Trypanosomiden.

Eine der Formen zeigt einen grossen, eiförmigen Blepharoplasten, welcher sehr nahe oder ganz am Hinterende des Parasiten liegt und seinen grössten Durchmesser in transversaler Richtung hat. In Folge der trockenen Fixation bilden sich in der Regel seitliche Hervorragungen des Blepharoplasten, der als transversaler Chromatinbalken erscheint, bei welchen die beiden Enden nicht vom Plasma eingefasst sind. Bei dieser Form beobachtet man häufig ein zweites Chromatinelement, das als innig verbundenes Anhängsel des Blepharoplasten erscheint und der Centralspindel und dem Basalkorn entspricht, was in feucht fixiertem Präparate sehr deutlich wird. Der Hauptkern hat gewöhnlich eine ovale Form oder erscheint als langes, in Längsrichtung gelagertes Chromatinband; die letzte Form scheint eine frühere Phase in der Entwicklung des Kernes anzudeuten. Man erkennt häufig im Innern des Nucleus ein stärker ge-

tante da extremidade posterior do organismo. Nesta fórma o nucleo aprezenta-se sempre como longa faixa lonjitudinal. Acreditamos tratar-se aqui de fórmas de evolução, nas quais a emigração do blefaroplasto para a extremidade do parazito vae-se realizando. Identico aspeto observámos algumas vezes em cobaias, inoculadas com parazitos vindos dos conorrinos.

Não raro é observar-se no sangue humano fórmas do tripanozómida incluidas nas hemátias, sendo demonstrativo deste fato a figura 28 da Est. 10.

Morfolojia do Schizotrypanum cruzi, de orijem humana, no sangue do Callithrix penicillata.

A inoculação do sangue de nossa doente BERENICE em *Callithrix penicillata* forneceu-nos intensa infeção, com abundancia do parazito no sangue periferico, de modo a termos podido estudar minuciozamente a morfolojia do tripanozómida.

Uzámos, como processo de tecnica, além da coloração pelo metodo de GIEMSA, o recente processo de ROSENBUSCH, do qual tivemos conhecimento pelo Dr. MAX HARTMANN. Consta do seguinte o metodo de coloração de ROSENBUSCH: Fixação a humido, pelo sublimado-alcool, segundo SCHAUDINN, durante vinte minutos ou meia hora; passajem dos *frottis* pelos alcooles a 70° e 95°, permanecendo de 10 a 15 minutos em cada; lavajem com agua distilada e permanencia de duas horas em solução a 3,5 °/₀ de alumen ferrico; nova lavajem em agua distilada e coloração, durante 5 minutos, em solução a 1 °/₀ de hematoxilina em alcool a 96 °/₀, adicionada de algumas gotas de solução concentrada de carbonato de litio; lavajem dos preparados em agua corrente e diferenciação em solução aquoza a 2,5 °/₀ de alumen ferrico; dezhidratação e montajem no balsamo. A mistura córante deve aprezentar a côr de vinho tinto, sendo necessario que a solução alcoolica de hematoxilina tenha sido preparada com antecedencia nunca menor de 4 semanas. A parte mais delicada do

färbtes Chromatinkörperchen, welches dem Caryosom entspricht.

Die undulierende Membran zeigt eine wechselnde Anzahl von Ausbuchtungen, die natürlich von den Bewegungzuständen abhängen, in welchen der Parasit fixiert wurde. Die Geissel, welche, so weit man sehen kann, vom Blepharoplast selbst oder dem erwähnten Chromatinelement, welche sich an diesen anschliesst, entspringt, verläuft quer von einem zum anderen Ende des Organismus, gewöhnlich sehr nahe oder direkt im Niveau des Kernes und zeigt einen freien Teil, von wechselnder Länge, aber immer kürzer, als in der andern Form, die ich noch näher beschreiben werde. Das Vorderende des Parasiten ist zugespitzt, indem die freie Geissel bis zu einer gewissen Höhe von einem dünnen Protoplasmafortsatz begleitet ist.

Die zweite im menschlichen Blute beobachtete Form unterscheidet sich von der vorigen besonders durch Grösse und Aussehen des Blepharoplasten und des Kernes.

Hier ist der Blepharoplast mehr oder weniger rund, am Hinterende des Organismus liegend und bedeutend kleiner als bei der vorigen Form; auch zeigt er in der Regel bei der angewandten Technik kein deutliches Chromatinhängsel. Auch der Nucleus ist rund und das Chromatin erscheint weniger verdichtet, so dass man manchmal seine Zusammensetzung aus verschiedenen Chromatinkörnern unterscheiden kann. Endlich zeigt bei dieser Form das Plasma eine deutlich grössere Breite, wie in der vorigen.

Ich habe ausserdem im Blute unserer Patientin noch eine Form des Trypanosoma beobachtet, in welcher der Blepharoplast im Gegensatz zum gewöhnlichen Befunde sich sehr weit vom Hinterende des Organismus befindet; dabei zeigt sich der Kern immer als ein langes und längsgerichtetes Chromatinband. Ich halte dies für eine Entwicklungsform, in welcher die Wanderung des Blepharoplasten nach dem Hinterende des Parasiten sich eben vollzieht; einen ähnlichen Anblick beobachtete ich einigemale bei Meerschweinchen, welche mit von *Conorhinus* stammenden Parasiten geimpft waren.

processo é a diferenciação; desta depende, essencialmente, o sucesso dos preparados. Por outro lado, cumpre observar que alguns protozoarios rezistem mais á diferenciação pelo alumen, quando outros deixam escapar mais depressa a materia córante; pelo que, o gráu de diluição da substancia diferenciadora deverá variar e será conhecido para cazo especial, de acordo com ensaios realizados.

Obtivemos com este metodo de pesquizas, os melhores rezultados nas diversas fazes da evolução, tendo chegado ao conhecimento das mais finas estruturas do tripanozómida, não apreciaveis pelos outros metodos.

No *Callithrix* pelo metodo de GIEMSA, o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta os aspetos morfolojicos descritos no sangue do doente, sendo de notar, porém, que nas fórmas de grande blefaroplasto este se aprezenta ainda maior que no sangue humano. Interessantes foram os rezultados fornecidos pelo processo de ROSENBUSCH: Bem evidente é aqui o dimorfismo do tripanozómida e, em vista do processo de fixação uzado, devemos considerar os aspetos morfolojicos verificados como absolutamente verdadeiros e não determinados por acidentes de tecnica.

Uma das fórmas do tripanozómida mostra grande blefaroplasto, quazi sempre ovoide, situado proximo da extremidade posterior do organismo; neste blefaroplasto distingue-se grande corpusculo central, esferico ou ovoide, intensamente córado, e zona externa clara, limitada por membrana delgada, de contorno, ás vezes, regular. E' a zona de suco nuclear do nucleo-blefaroplasto, como acaba de demonstrar ROSENBUSCH para diversos tripanozômos. Nos exemplares cuja fixação e coloração tenham sido bem sucedidas, observa-se, partindo do blefaroplasto, quazi sempre em ligação com o cariozoma deste, cone fibrilar de aspeto difuzo, na extremidade do qual ha pequeno corpusculo intensamente córado. Esta ultima estrutura é o fuzo central e o corpusculo da extremidade, ponto de emergencia do flajelo, é o corpusculo bazal. Esse aspeto corresponde ás observações de ROSENBUSCH; aqui, porém, com muito maior nitidez.

Nicht selten beobachtet man im menschlichen Blute auch Trypanosomenformen, die in den Blutkörperchen eingeschlossen sind, wie die Figur 28, Taf. 10 zeigt.

Morphologie des von Menschen stammenden Schizotrypanum cruzi in der Callithrix penicillata.

Die Ueberimpfung des Blutes unserer Patientin BERENICE auf eine *Callithrix penicillata* ergab eine intensive Infektion mit zahlreichen Parasiten im peripherischen Blute, so dass ich die Morphologie des *Schizotrypanum* genau studieren konnte.

Von technischen Verfahren benützte ich neben der Methode von GIEMSA auch die neue von ROSENBUSCH, deren Kenntnis ich den Vorlesungen von Dr. MAX HARTMANN verdanke. Dieselbe besteht in Folgendem: feuchte Fixierung durch Sublimalalkohol nach SCHAUDINN während 20 bis 30 Minuten, Durchführen der Ausstriche durch Alkoholgemische von 70 bis 95 Grad (bei einem Aufenthalte von 10 bis 15 Minuten in jedem derselben) und zurück; Abspülen im destillierten Wasser und zweistündigem Verweilen in einer 3,5 % Eisenalaunlösung; abermaligem Abspülen in aqua destillata und Einlegen während eines Zeitraums von 5 Minuten in eine 1 % Lösung von Hämatoxylin in 96 % Alkohol, welcher einige Tropfen einer konzentrierten Lithiumkarbonatlösung zugesetzt werden. Hierauf werden die Ausstrichpräparate in fliessendem Wasser gewaschen und in einer 2,5 % wässerigen Eisenalaunlösung differenziert; dann wird das Präparat deshydratiert und in Balsam eingeschlossen. Die Farbelösung soll eine Rotweinfarbe zeigen und die Hämatoxylinlösung wenigstens vier Wochen früher hergestellt sein.

Der delikateste Teil des Verfahrens ist die Differenzierung und davon hängt hauptsächlich das gute Resultat ab. Jedoch muss bemerkt werden, dass einige Protozoen der Differenzierung durch Alaun länger widerstehen, während andere den Farbstoff schneller abgeben; deswegen muss der Verdünnungsgrad der differenzierenden Substanz wechseln und sich in jedem Falle nach zuvorgemachten Ver-

O nucleo principal nesta fórma é ovoide, com membrana muito regular, bastante espessa, e com grande cariozoma esferico no centro. A zona de suco nuclear é quazi sempre clara, inteiramente sem cromatina, ou aprezenta raras e finas trabeculas desta substancia.

A membrana ondulante, cuja largura é igual a pouco mais do terço da largura do plasma, aprezenta pequeno numero de ondulações e não deixa, por este processo, perceber estrutura especial. O flajelo parte, em alguns exemplares, do corpusculo bazal, situado no apice do cone fibrilar; ás vezes, porém, não é perceptivel o fuzo central nem o corpusculo bazal, emerjindo, então, o flajelo diretamente da membrana do nucleo-blefaroplasto. Pode-se supor que, em tais cazos, o fuzo central dezaparece e que o corpusculo bazal se torne invizivel em consequencia de enrugamento. O plasma aprezenta, ás vezes, estrutura alveolar bem nitida; em alguns exemplares, porém, mostra estrutura mal caraterizada, de aspeto difuzo, ou mais ou menos reticular. As extremidades do parazito são afiladas, ponteagudas.

A outra forma distingue-se da precedente pelo tamanho muito menor do blefaroplasto e pelo aspeto do nucleo. Aqui, o nucleoblefaroplasto, ora esferico, ora ovoide, aprezenta ainda um corpusculo central (cariozoma), menor que o da forma precedente, cercado de zona clara, em cuja periferia existe circulo de substancia cromatica, com o aspeto de membrana. Partindo do cariozoma do blefaroplasto, é geralmente vizivel o fuzo central, com o corpusculo bazal na extremidade.

O nucleo é esferico, com cariozoma central menor que na forma precedente; zona de suco nuclear clara, sem substancia cromatica e membrana espessa. E' frequente nesta forma observar-se condição nuclear curioza, similar á verificada por JOLLOS nos coccidios e por ZÜLZER nos heliozoarios. Os nucleos (Est. 13, fig. 1, 5, 6 e 7) aprezentam-se muitas vezes em estado de mitoze sem que seja observado qualquer outro estádio de divizão nos outros pontos do organismo celular. E' mitoze precoce do nucleo, precedendo a esquizogonia do parazito, fenomeno atualmente conhecido em cito-

suchen richten. Mit dieser Untersuchungsmethode erhielt ich bei verschiedenen Entwicklungsstadien die besten Resultate und erkannte die feinsten Strukturen des *Schizotrypanum*, welche bei den anderen Methoden nicht zu beobachten waren.

Nach der Methode von GIEMSA zeigt das *Schizotrypanum cruzi* die im Blute der Patientin geschilderten Formen auch bei der *Callithrix*; doch ist zu bemerken, dass bei den Formen mit grossen Blepharoplasten dieser noch grösser erscheint, als im menschlichen Blute. Sehr interessant waren die Ergebnisse der Methode von ROSENBUSCH: hier zeigt sich der Dimorphismus des Trypanosomiden sehr deutlich und im Hinblick auf die angewandte Fixierungsart kann man die beobachteten morphologischen Bilder als natürliche und nicht durch technische Zufälligkeiten verursachte ansehen.

Eine der Trypanosomenformen zeigt einen grossen, fast immer eiförmigen Blepharoplasten am Hinterende des Organismus, in welchem man einen grossen runden oder eiförmigen Centralkörper erkennt, welcher intensiv gefärbt ist; ferner eine äussere helle Zone, welche durch eine dünne Membran mit nicht selten ganz regelmässigem Umrisse begrenzt wird. Es ist dies die Kernsaftzone des Blepharoplastkernes, wie dies ROSENBUSCH neuerdings für verschiedene Trypanosomen gezeigt hat.

An solchen Exemplaren, bei welchen Fixation und Färbung gut gelungen sind, beobachtet man vom Blepharoplasten ausgehend und fast immer in Verbindung mit dem Caryosom desselben, einen faserigen Kegel von diffusem Aussehen, der an seinem Ende ein stark gefärbtes Körperchen trägt. Dieses Strukturelement ist eine Centralspindel und das endständige Körperchen, von den die Geissel entspringt, ist das Basalkörperchen. Auch dies entspricht den Befunden von ROSENBUSCH, ist in unsern Falle aber noch deutlicher.

Bei dieser Form ist der Hauptkern eiförmig, mit regelmässiger dickerer Membran und einem grossen runden Caryosom im Zentrum. Die Kernsaftzone ist fast immer hell, ganz ohne Chromatin oder schliesst nur wenige und feine Bälkchen dieser Substanz ein. Die undulierende Membran, deren Breite etwas mehr als

lojia de protozoarios. Diversos dos nossos dezenhos registam este fato e num delles (Est. 13, fig. 1) observa-se, bem nitida a divizão do centriolo com formação do fuzo central (*Centralspindel*); as duas metades do nucleo são deziguais, o que não indica, como poderia parecer á primeira vista, divizão heteropolar, mas deve antes significar dezigualdade na evolução das duas partes do nucleo, como é de regra observar, segundo JOLLOS, no coccidio «*Adelea ovata*». Permanece, nesta figura, ainda intata a membrana nuclear, apezar de quazi completa a divizão das substancias do interior.

E' digno de salientar, na citolojia deste tripanozómida, a estrutura do blefaroplasto. Este se aprezenta com todas as partes e com a organização identica á do nucleo, com cariozoma, zona do suco nuclear, correspondendo ao halo claro que circumda este e membrana nuclear, de contorno nem sempre muito nitido. O modo de encarar o assunto pela escola de SCHAUDINN, por V. PROWAZEK, HARTMANN, etc., que consideram o blefaroplasto como segundo nucleo, o nucleo locomotor dos tripanozomidas, tem aqui solido apoio.

Morfolojia e ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi no organismo da cobaia.

Foi no organismo da cobaia que estudámos, principalmente, o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, sendo nossa descrição bazeada em grande numero de experiencias com aquelle animal. Das fazes principais do ciclo evolutivo, principalmente daquellas que constituem, na evolução deste tripanozómida, fenomeno não conhecido nas outras especies, procurámos e obtivemos confirmação no organismo do *Callithrix penicillata*, do cão e de outros animais sensiveis.

No sangue periferico das cobaias inoculadas e sistematicamente estudadas o *Schizotrypanum cruzi* tem primeira faze de evolução no interior das hemátias e outra livre no plasma, conforme acima dissemos. Já nas formas intraglobulares a dualidade morfolojica é bem acentuada, aprezentando-se uma das

einem Drittel der Breite des Plasmakörpers gleich kommt, zeigt eine geringe Zahl von Ausbuchtungen und lässt bei diesem Verfahren keine besondere Struktur erkennen. Die Geissel enspringt bei einigen Exemplaren von dem Basalkörperchen, das am Ende des Faserkegels liegt; manchmal ist jedoch weder die Centralspindel, noch das Basalkörperchen sichtbar und es entspringt dann die Geissel direkt der äusseren Membran des Blepharoplastkernes. Man kann annehmen, dass dann die Centralspindel rückgebildet und das Basalkorn infolge Schrumpfung unsichtbar geworden ist.

Das Plasma zeigt bei einigen Exemplaren eine sehr deutliche alveoläre Struktur, bei anderen jedoch einen undeutlichen diffusen, mehr oder weniger netzartigen Bau. Die Enden der Parasiten sind verschmälert und zugespitzt.

Die andere Form unterscheidet sich von der vorigen durch die viel geringere Grösse des Blepharoplasten und das Aussehen des Kernes. Hier zeigt der bald runde, bald eiförmige Blepharoplastkern ein kleineres Caryosom als in der vorigen Form, welches ebenfalls von einer helleren Zone umgeben ist, die in ihrer Peripherie einen Kreis von chromatischer Substanz in der Form einer Membran enthält. Vom Blepharoplastcaryosom entspringend, sieht man gewöhnlich die Centralspindel mit dem Basalkörperchen an einem Ende.

Der Kern ist rund, mit einem kleineren zentralen Caryosoma als in der vorigen Form, einer hellen Kernsaftzone ohne chromatische Substanz und dicker Membran. Bei dieser Form beobachtet man häufig einen sonderbaren Zustand des Kernes. Aehnliches wurde (nach mündlichen Mitteilungen von Dr. HARTMANN) von JOLLOS bei *Coccidien* und von ZÜLZER bei *Heliozoen* beobachtet (Fig. 1, 5, 6 u. 7, Taf. 13).

Die Kerne zeigen sich oft im Zustande der Mitose, ohne dass man an den anderen Teilen des Zellorganismus Teilungen erblicken könnte. Es handelt sich um eine frühzeitige Mitose des Kernes, welche einer Schizogonie des Parasiten vorangeht, eine heutzutage in der Cytologie der Protozoen bekannte Er-

formas, nos preparados tratados pelo GIEMSA, com grande blefaroplasto colocado na extremidade posterior e com nucleo muito longo, lonjitudinalmente disposto (Est. 10, fig. 11 e 12). A outra forma caracteriza-se pelo blefaroplasto menor, pelo aspeto do nucleo que, ao em vez de ser longo e estar lonjitudinalmente disposto, aprezenta-se ovoide, com a cromatina menos condensada, e, finalmente pela largura maior do plasma. Numa e noutra fórma o blefaroplasto, que, nos organismos completamente dezenvolvidos se acha quazi na extremidade posterior, póde ser visto afastado desta, mais para as proximidades do nucleo.

Em algumas fórmas intra-globulares não existem ainda o flajelo e a membrana ondulante, tambem auzentes, ás vezes, das formas prezas ás hemátias pelo blefaroplasto (Est. 10, fig. 17 e 18). Nestas ultimas, muito frequentes conforme dissemos, não é raro ver-se o nucleo localizado em porção dilatada do parazito, que se aprezenta com aspeto piriforme (Est. 10, fig. 16 e 17). E' frequente nas hemátias a que se acham prezos tripanozomidas ver-se a impressão deixada no globulo pelo parazito, parecendo nem sempre haver destruição do globulo vermelho parazitado. Não vimos, jamais, qualquer aspeto de pigmentação das hemátias em que se achavam tripanozomidas incluidos.

Abundantes no inicio da infeção, as fórmas intra-globulares do parazito são vistas em qualquer periodo, em maior ou menor quantidade, o que não admira, visto serem ellas faze necessaria na evolução deste flagelado.

Os tripanozomidas livres no plasma aprezentam morfolojia semelhante á das fórmas intra-globulares. E minuciozamente tratámos dessa morfolojia, quando descrevemos o parazito do sangue do sagui inoculado com sangue humano, pelo que, quazi nada nos resta dizer.

A dualidade de fórma continúa evidente. E, admitindo diferenciação sexuada relativa á diversidade morfolojica, deveremos considerar femea a fórma com blefaroplasto menor, quazi sempre esferico, com nucleo ovoide de cromatina frouxa, nas colorações pelo GIEMSA,

scheinung. Verschiedene unserer Zeichnungen geben diesen Vorgang wieder und auf einer derselben (Fig. 1, Taf. 13) sieht man deutlich die Teilung des Centriols mit Bildung der Centralspindel (Centrodesmose); die beiden Hälften des Nucleus sind ungleich, was nicht, wie es auf den ersten Blick scheinen könnte, eine heteropolare Teilung beweist, sondern, wie das nach JOLLOS auch bei der Coccidie *Adelea ovata* in der Regel der Fall ist, eher eine Ungleichheit in der Entwicklung der beiden Teile des Kernes andeutet. Es bleibt in dieser Figur die Kernmembran noch unverändert, obgleich die Substanzen im Innern schon fast vollständig geteilt sind.

Bei der Cytologie dieses Trypanosomas verdient die Struktur des Blepharoplasten hervorgehoben zu werden. Derselbe zeigt sich in allen seinen Teilen und in seiner Organisation als identisch mit dem Nucleus, indem er ein Caryosom, eine Kernsaftzone (der das erstere umgebende, helle Hof) und eine Kernmembran mit — nicht immer sehr deutlichem — Umrisse besitzt. Hier findet die Anschauungsweise der SCHAUDINN'schen Schule (PROWAZEK, HARTMANN, u. s. w.), welche den Blepharoplasten als zweiten, lokomotorischen Kern der *Trypanosomen* ansieht, eine feste Stütze.

Morphologie und Entwicklungskreislauf des Schizotrypanum cruzi im Organismus der Meerschweinchen.

Den Entwicklungskreis des *Schizotrypanum cruzi* habe ich ganz besonders am Meerschweinchen studiert und meine Beschreibung beruht auf einer grossen Anzahl an diesen Tieren gemachter Versuche. Von den hauptsächlichsten Entwicklungsphasen dieses Trypanosomas, besonders denjenigen, welche noch unbekannte Vorgänge darstellen, suchte und fand ich die Bestätigung im Organismus der *Callithrix penicillata*, des Hundes und der anderen empfänglichen Tiere.

Im peripherischen Blute der geimpften und systematisch studierten Meerschweinchen hat das *Schizotrypanum cruzi* eine erste Entwicklungsphase im Innern der Blutkörperchen und eine zweite frei im Plasma, wie ich oben aus-

plasma mais largo. A outra fórma, de maior blefaroplasto, nucleo comprido e ovoide, plasma mais estreito, será, então, a fórma macha.

Não temos idéa formada, por emquanto, respeito á relação numerica entre essas duas fórmas no correr da infeção; certo é, porém, que em dados momentos ha predominancia evidente de uma sobre a outra.

Nas primeiras fazes de infeção observa-se no sangue periferico grande diversidade nas dimensões das fórmas de flajelados; encontram-se organismos, intra-globulares ou livres no plasma, muito estreitos e de pequeno comprimento, com nucleo longo, em faixa, ou arredondado, indicando assim, desde este estádio joven, a dualidade morfolojica (Est 10, fig. 22, 23 e 24). Nos preparados, segundo ROSENBUSCH, encontrámos minucias de estrutura que merecem especial referencia. Os flajelados do plasma aprezentam blefaroplasto com a estrutura nuclear já descrita a propozito do tripanozomida humano no sangue; identica, tambem, é a estrutura do nucleo, havendo ainda figuras muito tipicas de mitoze precoce. O aspeto do plasma, da membrana ondulante e do flajelo é identico aos descritos para o tripanozomida, no macaco. O que observámos aqui de interessante foi a prezença frequente de estrutura fibrilar especial, constituida de unica fibrila espessa (Centrodesmoze), ligando o nucleo ao blefaroplasto (Est. 13, fig. 5, 6 e 8). Parece tratar-se do fuzo central da divizão heteropolar, o qual teria permanecido, apoz as formações do blefaroplasto.

Esquizogonia do Schizotrypanum cruzi no pulmão de vertebrado.

As mais minuciozas pesquizas nunca nos permitiram verificar qualquer aspeto que pudesse ser considerado como divizão lonjitudinal do *Schizotrypanum cruzi* no sangue periferico, ou nos orgãos profundos. Este fato, de si, indicava a existencia de outro processo de multiplicação, que pesquizámos e verificámos amplamente, constando elle de esquizogonia do flagelado no pulmão dos animais infetados. Não temos ainda deter-

einandergesetzt habe. Schon bei den intraglobulären Formen ist die morphologische Dualität gut gekennzeichnet, indem eine der Formen in Präparaten, die nach GIEMSA gemacht sind, einen grossen, am Hinterende liegenden, Blepharoplasten und einen sehr langen, längsgerichteten Kern zeigt (Fig. 11, 12, Taf. 10). Die andere Form charakterisiert sich durch kleineren Blepharoplasten und die Form des Kernes, welcher, statt lang und längsgerichtet, eiförmig und mit weniger dichtem Chromatin versehen erscheint, endlich durch die grössere Breite des Plasmakörpers. In beiden Formen kann der Blepharoplast, der in ganz entwickelten Organismen sich beinahe am Hinterende findet, von diesem entfernt und mehr in der Nähe des Kernes gesehen werden.

Bei einigen der intraglobulären Formen fehlt die Geissel und die undulierende Membran, welche auch zuweilen bei den Formen, die mittelst des Blepharoplasten an den Blutkörperchen haften, vermisst werden (Fig. 17 und 18, Taf. 10). Bei letzteren, die, wie gesagt, sehr häufig sind, sieht man öfters den Kern in einer erweiterten Portion der birnförmig erscheinenden Parasiten liegen (Fig. 16 und 17, Taf. 10). Nicht selten erkennt man in den Blutkörperchen, denen Trypanosomiden anhaften, den vom Parasiten zurückgelassenen Eindruck, wobei dasselbe nicht immer zerstört zu werden scheint. Niemals habe ich bei den eingeschlossenen Trypanosomiden irgend eine Andeutung von Blutpigment gesehen.

Die zu Anfang der Infektion häufigen, intraglobulären Parasitenformen werden zu jeder Zeit in grösserer oder geringerer Menge beobachtet, was nicht verwundern kann, da sie eine notwendige Entwicklungsphase dieses Flagellaten darstellen; die im Plasma frei vorkommenden Trypanosomiden zeigen eine Morphologie, welche derjenigen der intraglobulären Formen ähnlich ist. Dieselbe ist eingehend behandelt worden, als ich den Parasiten der mit menschlichem Blut geimpften Pinseläffchen beschrieb, weshalb nichts mehr darüber gesagt zu werden braucht. Die Dualität der Formen bleibt auch weiterhin deutlich. Wenn man entsprechend der verschiedenen Morphologie einen Geschlechtsunterschied an-

minismo seguro para surpreender a faze de esquizogonia do parazito, com facilidade. E' que a virulencia do *Schizotrypanum cruzi* parece variar de acordo com diversos fatores, ainda não determinados, parecendo delles o mais importante a passajem atravez do organismo da mesma especie animal. Assim é que, em nossas experiencias, a inoculação de 1 centimetro cubico de sangue de cobaias infetadas por conorrinos, matava, quazi seguramente, os animais, em 5 dias, aprezentando as cobaias grande abundancia de fórmas esquizogonicas no pulmão e alguns flajelados no sangue periferico. Apoz algumas passajens em cobaias, porém, o tripanozómida não matava mais os animais naquelle espaço de tempo, vindo as cobaias a morrer apoz 1 ou 2 mezes, geralmente com intensa infeção e sendo encontradas, no pulmão, grande abundancia de fórmas esquizogonicas. Por outro lado, em qualquer faze da molestia encontram-se poucas fórmas de multiplicação, sendo as vezes dificil verificar, nestas condições, a esquizogonia.

De multiplas experiencias concluimos ser o melhor processo, para obter abundancia de fórmas esquizogonicas, a inoculação intraperitoneal de 1 a 2 centimetros cubicos de sangue de cobaia infetada por conorrinos, sacrificando-se os animais, quando não morram, do 5.º ao 6.º dia depois da inoculação.

A abundancia de fórmas de esquizogonia no momento da morte dos animais com infeção demorada (cronica) e o menor numero dellas em outras fazes da molestia, nos animais sacrifacados, faz-nos acreditar em multiplicações periodicas do parazito, que seriam verdadeiras recrudecencias da molestia; tanto mais quanto, no sangue periferico, a quantidade de flajelados aprezenta ocilações, cujas normas não nos foi possivel ainda determinar.

No pulmão, a esquizogonia, como a do parazito da malaria, realiza-se nos capilares, multiplicando-se o tripanozómida do seguinte modo: Os parazitos perdem o flajelo e a membrana ondulante, deslocando-se o nucleo de sua pozição normal para o lado da extremidade anterior; esta extremidade, por movimento de flexão do organismo, aproxima-se

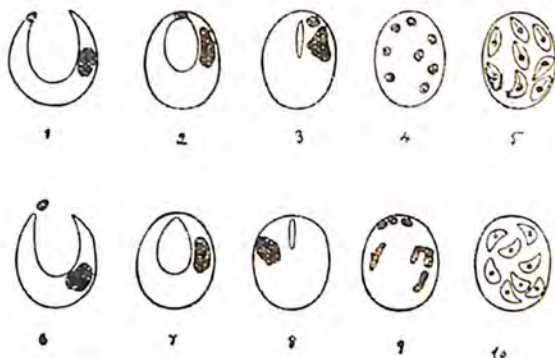
nimmt, müssen wir die Formen mit kleinerem, gewöhnlich rundem Blepharoplasten, mit eiförmigem, lockeres Chromatin enthaltendem Kerne und breiterem Plasmakörper (bei GIEMSA-färbung) als weibliche ansehen. Die andere Form mit grösserem Blepharoplasten, eiförmigem oder langgestrecktem Kerne und schmälerem Plasmakörper, wäre dann die männliche.

Ich habe zur Zeit noch kein sicheres Urteil über das Zahlenverhältnis, welches zwischen beiden Formen in Verlauf der Infektion besteht; jedoch steht soviel fest, das zu gewissen Zeiten die eine über die andere in auffallender Weise vorwiegt.

In den ersten Infektionsphasen beobachtet man im peripherischen Blute eine grosse Verschiedenheit in den Dimensionen der Flagellatenformen; man findet intraglobuläre und frei im Plasma vorkommende Organismen, die sehr schmal und kurz sind und einen breiten Kern haben, der bandförmig oder rund ist und die auf diese Weise schon im Jugendzustande die morphologische Dualität verraten. (Fig. 22, 23 und 24, Taf. 10). In den Präparaten nach ROSENBUSCH fand ich Struktureinzelheiten, welche eine besondere Erwähnung verdienen. Die Flagellaten im Plasma zeigen einen Blepharoplasten mit der — schon bei dem, vom Menschen abstammenden, Trypanosomiden des Pinseläffchens beschriebenen -- Struktur; auch der Bau des Kernes ist identisch, indem gleichfalls typische Bilder von frühzeitiger Mitose vorkommen. Plasma, undulierende Membran und Geissel gleichen vollständig den bei den Parasiten des Aeffchens beschriebenen Bildern. Besonders interessant war auch eine, häufig beobachtete, fibrilläre Struktur, welche aus einer einzigen dicken, Kern und Blepharoplast verbindenden, Fibrille (Centrodesmose) besteht. (Fig. 5, 6, 8, Taf. 13). Es scheint sich um den Rest der Kernspindel der heteropolaren Teilung zu handeln, welche nach der Bildung des Blepharoplasten weiter besteht.

Schizogonie des Schizotrypanum cruzi in der Lunge der Wirbeltiere.

Die eingehendsten Beobachtungen gestatteten mir niemals, im peripherischen Blute

da posterior com ella se fundindo; torna-se, então, esferico ou arredondado o parazito, e, é possivel ver ainda, em muitos exemplares, a fenda de separação entre as duas metades do organismo que se uniram lateralmente. O blefaroplasto tem, no fenomeno, duplo procedimento: Ora elle se separa do parazito, juntamente com o flajelo, antes que o tripanozómida se tenha tornado esferico, (Est. 10, fig. 31 a 36 e fig. do texto de 6 a 10) ora elle é conservado, funde-se com o nucleo e entra com elle em multiplicação. (Fig. do texto 1 a 5). Esta duplicidade de processo, em relação ao blefaroplasto, vem aliaz confirmada no aspeto das fórmas esquizogonicas completamente divididas. (Vide fig. 5 a 10 do texto).

Segue-se a divizão do nucleo; delle só, num dos casos; do nucleo e do blefaroplasto, no outro. O processo de divizão nuclear, os fenomenos celulares exatos deste momento do ciclo são ainda obscuros, porquanto não os estudámos, o que devemos fazer depois, com o emprego da fixação a humido e no estado vivo.

As fórmas segmentadas aprezentam 8 pequenos organismos claviformes, dispostos irregularmente no interior do espaço limitado por delgada pelicula que será, de certo, o periplasto do parazito. Esta pelicula, a um exame superficial, poderia impropriamente, fazer considerar as fórmas descritas como quistos, impressão fornecida, ainda, nos preparados fixados apoz dessecamento, por orla clara, de duplo contorno, que cerca o parazito nesta faze e que deverá ser explicada pela coagulação de substancias aderentes á

oder in den inneren Organen irgend ein Bild aufzufinden, welches als eine Längsteilung des Schizotrypanum angesehen werden könnte. Dies allein genügt, um die Existenz eines anderen Vermehrungsprozesses nahe zu legen; ich suchte einen solchen und fand ihn sehr reichlich: er besteht in einer Schizogonie des Trypanosomas in der Lunge der infizierten Tiere. Es fehlt noch an einem sicheren Anhaltspunkte, um die Schizogoniephase des Parasiten mit Leichtigkeit auffinden zu können. Der Grund liegt darin, dass die Virulenz des *Schizotrypanum cruzi* unter dem Einfluss verschiedener noch unbekannter Faktoren wechseln kann, wobei als der wichtigste die Passage durch den Organismus derselben Tierart erscheint. So tötete in unseren Versuchen die Einspritzung eines ccm. Blutes von Meerschweinchen, welche durch *Conorhinus* infiziert waren, die Tiere fast sicher in 5 Tagen, wobei die Meerschweinchen eine grosse Menge von Schizogonieformen in der Lunge und einige Flagellaten im peripherischen Blute zeigten. Nach einigen Meerschweinchenpassagen tötete aber das *Schizotrypanum* die Tiere nicht mehr in dieser Zeit, indem die Meerschweinchen ein bis zwei Monate später starben, gewöhnlich mit intensiver Infektion, wobei man in der Lunge eine grosse Menge von Schizogonieformen fand. Auf der anderen Seite finden sich in einer beliebigen Krankheitsphase nur wenige Vermehrungsformen, sodass es unter solchen Bedingungen schwer hält, die Schizogonie zu beobachten.

Aus zahlreichen Versuchen schliesse ich, dass die beste Methode, reichliche Schizogonieformen zu erhalten, in der Intraperitonealeinspritzung von 1 bis 2 ccm. Blut von Meerschweinchen, die durch *Conorhinus* infiziert wurden, besteht, wobei man die Tiere, wenn sie nicht sterben, am 5. oder 6. Tage nach der Einspritzung tötet.

Der Reichtum an Schizogonieformen bei Tieren mit chronischer Infektion im Momente des Todes und die geringere Zahl desselben bei — in anderen Phasen der Krankheit — getöteten — Tieren lässt mich an eine periodische Vermehrung des Parasiten glauben, wodurch eigentliche Rückfälle der Krankheit zu Stande

superficie da celula. Aliaz, aspeto identico é observado nas amebas em repouzo, especialmente nas culturas em agar, quer no estado vivo, quer no material fixado.

Aprezentam-se com dois aspetos, em relação á estrutura dos merozoitos, as fórmas segmentadas do parazito, bem estudadas nos preparados fixados pelo metodo de SCHAUDINN e córados pelo de ROSENBUSCH. Verificámos, assim, duas estruturas bem distintas: óra, os merozoitos se aprezentam com nucleo esferico, tendo pequeno cariozoma central e zona de suco nuclear distinta limitada por delgada membrana, (Est. 13, Fig. 26) não sendo encontrado nestes o blefaroplasto; óra se aprezentam com nucleo, possuindo maior quantidade de cromatina, tendo cariozoma maior que o das fórmas anteriores, esferico e unico, ou disposto em 2 lóbos; nestes vê-se quazi sempre o blefaroplasto, colocado na extremidade delgada do parazito e ligado ao nucleo por filamento cromatico (Est. 13, Fig. 25, 27 e 28) ou situado muito proximo do nucleo, delle apenas diferenciado. Na mesma fórma segmentada encontram-se, ás vezes, diversos estádios dos merozoitos em relação á pozição do blefaroplasto, conforme é facil verificar á fig. 27, Est. 13. Os merozoitos da primeira estrutura, que consideramos como fórmas femeas, são tambem menores que os outros, que acreditamos ser os elementos machos. E' bem de crer que as fórmas segmentadas, cujas unidades se aprezentam já com o blefaroplasto, individualizado, correspondam aos tripanozómidas que conservaram o blefaroplasto, e as outras sejam a esquizogonia dos flajelados cujo blefaroplasto fôra expelido com o flajelo, no momento de se tornarem esfericos, no pulmão. Nos preparados córados pelo GIEMSA é possivel verificar alguns pontos da estrutura descrita, especialmente a prezença ou auzencia do blefaroplasto. (Est. 11, Fig. 42, 43, 44 e 46). Alí, porém, o nucleo se aprezenta sem estrutura apreciavel, como massa de cromatina compacta, geralmente disposta em 2 lóbos. (Est. 11, Fig. 45).

Os merozoitos, parece, escapam individualmente do espaço limitado pela pelicula envolvente; não ha aqui, como para o cazo do

kommen, um so mehr, als im peripherischen Blute die Zahl der Flagellaten Schwankungen zeigt, deren Gesetz ich noch nicht feststellen konnte.

In der Lunge vollzieht sich die Schizogonie, wie bei Malariaparasiten, in den Kapillaren, indem das Trypanosoma sich auf folgende Weise vermehrt: die Parasiten verlieren Geissel und undulierende Membran, während der Kern sich aus seiner normalen Stellung nach dem Vorderende zu disloziert; dieses Ende nähert sich durch eine Biegung des Organismus dem Hinterende und verschmilzt mit demselben; der Parasit wird so rundlich oder kugelförmig und man kann bei manchen Exemplaren noch die Trennungsspalte zwischen den beiden Hälften der Organismen, die sich seitlich vereinigt haben, wahrnehmen. Der Blepharoplast zeigt bei dieser Erscheinung ein zweifaches Verhalten: bald trennt er sich von dem Parasiten, zugleich mit der Geissel, bevor sich das Trypanosoma abrundet; bald bleibt er erhalten und vereinigt sich mit dem Kern, mit dem zusammen er die Vermehrung eingeht. Diese Duplizität des Prozesses in Hinsicht auf das Verhalten des Blepharoplastes wird durch das Aussehen der bereits völlig geteilten Schizogonieformen weiter bestätigt.

Es folgt hierauf die Teilung, in einem Falle des Kernes allein, im anderen des Kernes und Blepharoplasten. Der Prozess der Kernteilung und die genaueren Vorgänge in der Zelle während dieser Phase sind noch unklar, da ich sie nicht, wie ich später zu thun gedenke, unter Anwendung der feuchten Fixierung oder im lebenden Zustande studiert habe.

Die Teilungsformen zeigen 8 kleine, keulenförmige Teilungsprodukte, die unregelmässig im Innern eines, von dünner Haut begrenzten, Raumes angeordnet sind; letzerer muss dem Periplast des Parasiten entprechen und könnte bei oberflächlicher Untersuchung die beschriebenen Formen unrichtigerweise als Cysten auffassen lassen. Dieser Eindruck wird in den nach dem Trocknen fixierten Präparaten auch durch einen hellen Saum mit doppeltem Kontur, welcher den Parasiten in diesem Zustande umgiebt, hervorgerufen;

parazito da malaria, rutura total da fórma segmentada. E' o que se deduz de nossos dezenhos onde são vistos organismos atravessando a pelicula, ainda intata, e outros já no exterior, aderentes á superficie externa.

São estes os pequenos organismos, rezultantes da esquizogonia do tripanozómida no pulmão, que penetram nos glóbulos vermelhos e evolvem, chegando ao estádio de flajelados. As fórmas jovens intra-globulares aprezentam morfolojia identica á descrita nos merozoitos do pulmão; vêm-se organismos com o blefaroplasto já individualizado (Est. 10, Fig. 1) e outros sem blefaroplasto (Est. 10, Fig. 2 e 3); este se acha misturado ao nucleo. A formação do blefaroplasto nas fórmas intra-globulares da ultima categoria dá-se por divizão heteropolar do nucleo, conforme indica nosso dezenho. Aí se vê o blefaroplasto, já diferenciado, ligado ainda ao nucleo pelo fuzo central da divizão heteropolar. Devemos referir aqui a necessidade de preparados muito bem sucedidos para o estudo das fórmas jovens intra-globulares, as quais, por outro lado, só se encontram, em grande abundancia, em certas fazes da infeção, especialmente na faze inicial.

Evolução do Schizotrypanum cruzi no organismo do inséto transmissor.

A maioria de nossas experiencias sobre a evolução do *Schizotrypanum cruzi*, no organismo do *Conorhinus*, tem sido realizadas em larvas novas do hemiptero, nacidas no laboratorio. Os insétos adultos e as ninfas, quando colhidos em rezidencias de individuos na condição morbida referida, aprezentam, quazi em totalidade, flajelados no intestino médio e no reto, pelo que não constituem material de escolha para observações sistematicas sobre o ciclo exojeno do parazito.

Da condição infecioza de larvas, quando mantidas em suas sédes naturais, não temos conhecimento, por emquanto; aquellas, porém, nacidas no laboratorio, embóra de ovos postos por insétos que aprezentam flajelados no intestino, não se mostram infetadas. E, para a verificação necessaria da hipoteze de que os

doch ist derselbe aus der Gerinnung der Zellenoberfläche anhängender Substanzen zu erklären. Uebrigens beobachtet man ein gleiches Bild bei den ruhenden Amöben, besonders in Agarkulturen, an lebendem sowohl, wie an fixiertem Material.

Die segmentierten Formen des Parasiten zeigen in Hinsicht auf die Struktur der Merozoiten eine doppelte Form, welche — in nach SCHAUDINN fixierten und nach ROSENBUSCH gefärbten Präparaten — gut studiert wurden. Auf diese Weise fand ich zwei deutlich verschiedene Strukturen: einmal zeigen die Merozoiten einen runden Kern, welcher ein kleines Caryosom und eine deutliche, von dünner Membran begränzte, Kernsaftzone aufweist (Taf. 13, Fig. 26), wobei kein Blepharoplast gefunden wird; im anderen Falle haben sie einen Kern mit grösserer Chromatinmenge und einen Caryosom, welches grösser als bei den vorigen Formen, einheitlich oder aus zwei Lappen gebildet ist; hier sieht man fast immer den Blepharoplasten am dünnen Ende des Parasiten liegend und mit dem Kerne durch ein Chromatinfilament verbunden (Tafel 13, Fig. 25, 27 und 28) oder auch nahe am Kerne gelegen und kaum von demselben differenziert. In derselben Teilungsform findet man zuweilen, in Hinsicht auf die Lage der Blepharoplasten, verschiedene Formen der Merozoiten, wie man leicht in der Fig. 27, Taf. 13 erkennen kann. Die Merozoiten der zuerst beschriebenen Struktur, welche wir als weibliche Form auffassen, sind ausserdem kleiner als die anderen, die wir für männliche Elemente halten. Es ist auch anzunehmen, dass die Teilungsformen, deren Teilstücke sich im Blepharoplasten schon individualisiert zeigen, denjenigen Trypanosomen entsprechen, welche den Blepharoplasten beibehalten haben, während die anderen die Schizogonie des Flagellaten darstellen, welche — bei der Abrundung in der Lunge — den Blepharoplasten mit der Geissel abgestossen haben. Bei, nach GIEMSA gefärbten, Präparaten kann man einige Einzelheiten der beschriebenen Strukturen erkennen, besonders die Gegenwart oder das Fehlen des Blepharoplasten (Taf. 11, Fig. 42, 43, 44 und 46). Doch zeigt sich hier der Kern ohne erkennbare Struktur, als

flajelados das larvas em experiencia fossem parazitos naturais dellas, transmitidos por herança e cultivados no sangue injerido, procedemos, em muitas de nossas pesquizas, de modo a izentar os rezultados daquella cauza alegavel de erro. Assim é que dividiamos a coleção de larvas, nacidas dos ovos de determinada postura, em duas partes, alimentando uma dellas em animal infetado e a outra em animais indenes. A auzencia, multiplas vezes verificada, de flajelados no tubo dijestivo das larvas nutridas em animais normais, com a prezença simultanea de parazitos nas outras, elimina, de uma vez, a objeção possivel de infeção hereditaria do inséto e de cultura, nelle, de fórmas parazitarias preexistentes.

Algumas das fazes do ciclo evolutivo do flajelado foram verificadas em insétos adultos, nos quais, aliaz, repetimos muitas vezes as observações feitas nas larvas. Nas ninfas as pesquizas encontram maior dificuldade, porque nellas o sangue, na porção quilifica do intestino médio, sofre modificações rapidas, transformando-se desde o 3.º ao 4.º dia apoz a injestão, em massa extremamente compata e dura, na qual a fixação e coloração do parazito tornam-se quazi impossiveis.

O tubo dijestivo das larvas de *Conorhinus*, de 15 a 20 horas, apoz a primeira injestão de sangue, aprezenta, em relação ao conteúdo, duplo aspeto: Na porção quilifica do intestino médio, que se mostra dilatada ao extremo, ovoide, encontra-se sangue vermelho, em via de dijestão; na porção cilindrica, estreita, encontra-se liquido negro, granulozo, que reprezenta o rezultado da dijestão do sangue. Depois de 30 horas aparece no conteúdo liquido amarelado. A permanencia de sangue no intestino quilifico é longa, sendo elle aí encontrado até o 5.º dia depois da injestão.

Nos insétos adultos, recentemente alimentados, o aspeto do tubo dijestivo é identico, com pequenas variantes, ao das larvas; naquelles, porém, deixados em jejum desde alguns dias, 8 pelo menos, a porção quilifica não aprezenta sangue, contendo só um liquido incolor espumozo.

eine kompakte, gewöhnlich zweilappige Chromatinmasse (Taf. 11, Fig. 45).

Wie es scheint, schlüpfen die Merozoiten einzeln aus dem von der umgebenden Membran begrenzten Raume aus, indem es hier nicht, wie im Falle der Malariaparasiten, zu einem gänzlichen Zerfall der Teilungsform kommt. Dies kann man aus unseren Zeichnungen ersehen, wo man Organismen erkennt, welche die noch erhaltene Membran durchsetzen und andere schon freiliegende, welche der äusseren Fläche anhaften.

Diese kleinen aus der Schizogonie in der Lunge hervorgehenden Organismen sind es, welche in die roten Blutkörperchen eindringen und sich zur Phase von Flagellaten entwickeln. Die jungen endoglobulären Formen zeigen eine identische Morphologie, wie die beschriebenen Merozoiten der Lunge, indem man Organismen mit schon individualisierten Blepharoplasten sieht, wobei derselbe noch mit dem Kern vereinigt ist (Tafel 10, Fig. 1), neben anderen ohne solchen (Taf. 10, Fig. 2 und 3).

Die Bildung des Blepharoplasten in der letzten Art von intraglobulären Formen erfolgt durch heteropolare Kernteilung, wie unsere Zeichnung zeigt. Hier sieht man den Blepharoplasten schon differenziert, aber noch mit dem Kerne durch die Centralspindel der heteropolaren Teilung verbunden. Ich muss hier die Notwendigkeit gut gelungener Präparate für das Studium der jungen intraglobulären Formen betonen; letztere finden sich überdies nur in gewissen Phasen, besonders zu Beginn der Infektion, in grosser Menge.

Entwicklung des «Schizotrypanum cruzi» im Organismus des Ueberträgers.

Die Mehrzahl meiner Versuche über die Entwicklung des *Schizotrypanum cruzi* im Organismus des *Conorhinus* stellte ich an jungen Larven dieser Wanze an, welche im Laboratorium ausgeschlüpft waren. Erwachsene Insekten und Nymphen, welche in den Wohnungen von Patienten mit den bereits geschilderten Krankheitserscheinungen gesammelt wurden, zeigten fast durchwegs Flagellaten im Mittel- und Enddarm, weshalb sie

Nas ninfas, desde o 5.º dia, o sangue, na porção quilifica do tubo dijestivo, transforma-se em massa compata, onde as pesquizas são dificeis.

As larvas só aceitam refeição 4 ou 5 dias apoz a eclozão. D'aí em diante, embóra com permanencia de sangue no intestino quilifico, sugam facilmente de 3 em 3 dias, repletando-se a cada refeição, ficando então com o abdome muito aumentado, de fórma ovoide.

De numerozas experiencias, realizadas sobre a evolução do *Schizotrypanum cruzi* no organismo do *Conorhinus*, temos colhido rezultados do mais alto interesse, quer para a biolojia particular daquelle flajelado, quer para o ponto de vista geral, para as questões de doutrina relativas ao mecanismo da transmissão dos hemoflajelados pelos invertebrados. Existem ainda, é certo, nesta parte de nosso trabalho, alguns pontos importantes não esclarecidos e cuja solução nos preocupa atualmente; do que ha feito, porém, será talvez possivel tirar ilações aproveitaveis ás pesquizas similares, achando-se, em nossos rezultados, esclarecidos muitos fenomenos, até aqui obscuros, do papel dos hospedeiros intermediarios nas tripanozomiazes.

Exporemos primeiro, simplesmente, nossas observações, estudando as transformações morfolojicas do parazito nas diversas fazes do ciclo; em considerações finais procuraremos então interpretar os fatos adquiridos, concluindo de acordo com as experiencias realizadas.

Decorridas 6 horas apoz a injestão, pelo *Conorhinus*, de sangue contaminado, têm lugar as primeiras modificações evolutivas do parazito.

O blefaroplasto, que nos organismos normais se acha muito proximo ou exatamente na extremidade posterior da celula, caminha dalí para as proximidades do nucleo, pondo-se em contato intimo com elle (Est. 11, Fig. 47 a 55). Si ha fuzão do blefaroplasto com o nucleo principal, não o sabemos com segurança, sendo, porém, provavel que isso aconteça, porquanto, em muitas fórmas, neste momento o blefaroplasto é visto no interior do nucleo, constituindo aí um corpusculo mais intensamente córado.

kein geeignetes Material für systematische Beobachtungen über den exogenen Entwicklungszyklus des Parasiten bilden.

Ueber die Infektiosität von Larven an ihrem natürlichen Fundort habe ich zur Zeit keine Erfahrung; jedoch zeigten sich die im Laboratorium gezüchteten nicht infiziert, obwohl die Eier von Exemplaren stammten, welche Flagellaten im Darme zeigten.

Es erschien notwendig, die Hypothese zu prüfen, dass die Flagellaten der beim Versuche gebrauchten Larven natürliche Parasiten derselben seien, die erblich übertragen werden und sich nach der Blutaufnahme vermehren; ich ging daher bei vielen meiner Untersuchungen so vor, dass ich die Möglichkeit dieser Fehlerquelle ausschloss. Ich teilte deshalb die, aus gleichzeitig abgelegten Eiern, ausgeschlüpften Larven in zwei Gruppen, von denen eine an einem infizierten Tiere, die andere an gesunden Tieren ernährt wurde. Die vielfach festgestellte Abwesenheit der Flagellaten im Darme der mit dem Blute normaler Tiere ernährten Larven und das gleichzeitige Vorkommen der Parasiten bei den andern schliesst vollständig den Einwand aus, dass eine hereditäre Infektion des Insektes und eine in demselben erfolgte Vermehrung präexistierter Parasiten vorliege.

Einige Phasen des Entwicklungszyklus der Flagellaten wurden bei erwachsenen Insekten festgestellt, bei welchen wir übrigens die an den Larven gemachten Beobachtungen oftmals wiederholten. Bei den Nymphen stossen die Untersuchungen auf grössere Schwierigkeiten, da bei denselben das Blut in dem chylusbildenden Teile des Mitteldarmes sich rasch verändert und vom dritten oder vierten Tage an eine äusserst kompakte und harte Masse darstellt, welche die Fixierung und Färbung des Parasiten fast unmöglich macht.

Der Darmkanal der *Conorhinuslarven* zeigt 15—20 Stunden nach der ersten Blutaufnahme eine zweifache Beschaffenheit seines Inhalts: Im chylusbildenden Teile des Mitteldarmes, welcher extrem erweitert und eiförmig erscheint, findet man rotes Blut im Stadium der beginnenden Verdauung; im engeren cylindrischen Teile ist eine schwarze körnige Flüssig-

Nesta primeira faze a maioria das fórmas já se aprezenta sem flajelo e sem membrana ondulante, o que faz acreditar seja a perda destas duas estruturas o fenomeno inicial da evolução; alguns organismos, porém, com o blefaroplasto muito proximo do nucleo, possuem ainda flajelo, cuja porção livre tem, então, maior comprimento que nos parazitos normais. Os organismos, assim modificados, tornam-se depois redondos (Est. 11, Fig. 58) e entram em multiplicação, ás vezes muita rapida, vendo-se grandes aglomerações de fórmas esfericas. Cumpre salientar que estas fórmas aparecem frequentemente sem blefaroplasto e que tambem se encontram figuras que denunciam nova formação do blefaroplasto achando-se elle ainda ligado ao nucleo principal pelo filamento central da divizão hetero-polar, e, finalmente, fórmas ha sem esta ligação entre os dois nucleos.

Estas fórmas são a principio aflajeladas e, nos preparados fixados humidos e córados pelo ROSENBUSCH, mostram a estrutura seguinte:

O plasma é alveolar, de colorido uniforme e aprezenta, na superficie, delgada camada mais condensada, que é o periplasto. O nucleo, de fórma esferica, colocado no centro da celula, mostra um grande cariozoma, em cujo centro, nos preparados mais diferenciados, é possivel, ás vezes nitidamente, verificar a prezença do centriolo (Est. 13, Fig. 9).

Em torno do cariozoma existe largo espaço claro, a zona de suco nuclear, atravessada, no sentido transversal, por finas trabeculas de linina, limitada por membrana de contornos muito regulares. Esta membrana, óra se aprezenta com aspeto homojeneo, óra mostra pequenos granulos de cromatina mais intensamente córados (Est. 13, Fig. 13) regularmente dispostos e equidistantes. A estes granulos prendem-se os filamentos de linina partidos do cariozoma.

O nucleo, assim descrito para a generalidade das fórmas observadas, aprezenta algumas variantes, relativas, sobretudo, á quantidade da substancia cromatica contida na zona do suco nuclear, onde, ás vezes, a cromatina

keit enthalten, welche das Endresultat der Blutverdauung darstellt. Nach 30 Stunden erscheinen im Rektum die Exkremente in Form einer gelblichen Flüssigkeit. Das Blut verweilt im Chylusdarm eine lange Zeit und wird daselbst noch 5 Tage nach der Aufnahme gefunden.

Bei erwachsenen, frisch gefütterten Insekten gleicht der Darmkanal demjenigen der Larven bis auf geringe Unterschiede; dagegen zeigen sie nach längerem, wenigstens 8-tägigem, Fasten im Chylusdarme nicht Blut, sondern eine farblose schaumige Flüssigkeit.

Bei den Nymphen verändert sich das Blut im Chylusdarme, wie gesagt, vom 5. Tage an in eine kompakte Masse.

Die Larven nehmen die Nahrung erst 5 bis 6 Tage nach dem Ausschlüpfen an. Von da an und trotz des Fortbestehens vom Blut im Chylusdarme, saugen sie ohne Umstände von 3 zu 3 Tagen, indem sie ihn jedes mal vollständig anfüllen, sodass der Hinterleib sehr vergrössert und eiförmig erscheint.

Aus den vielfachen Versuchen über die Entwicklung des *Schizotrypanum cruzi* in *Conorhinus* gewann ich höchst interessante Resultate, sowohl in Hinsicht auf die specielle Biologie dieser Flagellaten, als auch in Beziehung auf die allgemeine Lehre über den Vorgang der Uebertragung der Hämoflagellaten durch blutsaugende Schmarotzer. Allerdings gibt es in diesem Teile meiner Untersuchung einige Punkte, die noch unaufgeklärt sind und mich gegenwärtig beschäftigen; doch kann man wohl aus dem bereits Festgestellten Schlüsse ziehen, welche für ähnliche Untersuchungen von Nutzen sind, da sich hier die Erklärung vieler bisher dunkler Erscheinungen in Beziehung auf die Rolle des Zwischenwirtes bei Trypanosomenerkrankungen findet.

Ich gebe zuerst nur meine Beobachtungen wieder, aus welchen die morphologischen Veränderungen des Parasiten in den verschiedenen Entwicklungsstadien ersichtlich sind; hierauf werde ich die Tatsachen zu erklären und aus den zahlreichen Experimenten endgiltige Schlüsse zu ziehen suchen.

Sechs Stunden nach der Aufnahme des parasitenhaltigen Blutes durch den *Conorhinus* gehen die ersten Veränderungen des Para-

é mais abundante, constituindo, em algumas fórmas, fina rêde na superficie interna da membrana nuclear. São variações que, na teoria de HARTMANN, devem ser atribuidas ás modificações ciclicas do cariozoma (lançamento de cromatina na zona de suco nuclear) e que são comparaveis a fenomenos similares observaveis na *Amoeba tetragena*.

O blefaroplasto aprezenta aqui aspeto comparavel ao descrito nos flajelados do sangue. Nelle existe um grande cariozoma, quazi sempre constituido por espessa barra de substancia cromatica, (Est. 13, Fig. 9 e 11) curva, aprezentando concavidade voltada, — nas fórmas jovens aflajeladas — para o lado do nucleo. Cérca o cariozoma do blefaroplasto zona clara, na qual não são viziveis filamentos cromaticos; é a zona do suco nucleo-blefaroplastico limitada por delgada membrana de contornos pouco regulares.

A pozição do blefaroplasto é, como já dissémos, variavel, achando-se, óra colocado no interior do nucleo, em qualquer ponto da zona do suco nuclear, óra aderente á superficie externa da membrana delle, óra, finalmente, distante do nucleo, a este ligado, ás vezes, pelo filamento central da divizão hetero-polar.

Nos preparados córados pelo GIEMSA, nesta como nas fazes seguintes da evolução exojena do flajelado, encontram-se granulações córadas em vermelho intenso, de dimensões variaveis. São identicas ás descritas por ROSENBUSCH nas culturas de hemoproteo e parecem ser granulações de volutina (SWELLENGREBEL).

A formação do aparelho flajelar inicia-se, muitas vezes, nestas fórmas esfericas, encontrando-se então, (Est. 13, Fig. 9, 11 e 12) como rezultado da divizão heteropolar do blefaroplasto, um cone de fibrilas, o *fuzo central com o rizoplasto do centro,* que aprezenta no apice um granulo de substancia cromatica, o *corpusculo bazal,* orijem do flajelo. Algumas vezes, nas fórmas esfericas, o flajelo só tem porção intra-celular, não existindo ainda, aí, flajelo livre; em alguns organismos, porém, já se encontra flajelo livre, que, frequentemente atinje grande comprimento.

siten vor sich. Der Blepharoplast, welcher beim normalen Organismus sich sehr nahe oder ganz am Hinterende der Zelle befindet, wandert von dort in die Nähe des Nucleus und tritt mit demselben in innige Berührung. (Taf. 11, Fig. 47 und 55). Ob eine Verschmelzung des Blepharoplasten mit dem Hauptkerne stattfindet, weiss ich zwar nicht gewiss, doch ist es wahrscheinlich, da man bei vielen Formen zu dieser Zeit den Geisselkern im Innern des Nucleus sieht und zwar in Gestalt eines stärker gefärbten Körnchens.

In diesem ersten Stadium zeigt sich die Mehrzahl der Formen bereits ohne Geissel und undulierende Membran, sodass man den Verlust dieser beiden Strukturen als die erste Erscheinung der Entwicklung auffassen kann; doch besitzen einige Formen, deren Blepharoplast dem Kerne sehr genähert ist, noch eine Geissel, deren freier Teil dann länger erscheint, als bei der normalen Parasitenform. Nach dieser Veränderung rundet sich der Organismus ab (Taf. 11, Fig. 58) und vermehrt sich, oft sehr schnell, durch Teilung, sodass man grosse Haufen von runden Formen sieht. Es verdient hervorgehoben zu werden, dass diese Formen häufig keinen gesonderten Blepharoplast zeigen und dass man Bilder trifft, die auf eine Neuentstehung des Blepharoplasten hinweisen. So findet er sich bald im Innern des Kernes, an einem beliebigen Punkte der Kernsaftzone, bald an der Aussenfläche — der Membran anliegend oder vom Nucleus entfernt, aber mit diesem manchmal durch die Centralfaser der heteropolaren Teilung verbunden —; schliesslich kann auch eine solche Verbindung fehlen. Diese Formen sind anfangs geissellos und zeigen in feuchtfixierten und nach ROSENBUSCH gefärbten Präparaten folgende Struktur: das Plasma erscheint alveolär und zeigt in der Oberfläche eine schmale Zone stärkerer Verdichtung, welche den Periplast darstellt. Der runde, im Zentrum der Zelle gelagerte, Kern zeigt ein grosses Caryosom, in dessem Zentrum man bei gut differenzierten Präparaten oft ganz deutlich ein Centriol (Taf. 13, Fig. 9) wahrnimmt. Das Caryosom ist von einem breiten hellen Hofe, der Kernsaftzone umgeben, welche

Sobre o flajelo, geralmente na extremidade delle, é visto muitas vezes um segundo granulo cromatico, menor que o corpusculo bazal, de colorido semelhante ao daquelle. A prezença de tal corpusculo se liga ao mecanismo de formação do flajelo, reprezentando elle, de acôrdo com a teoria de SCHAUDINN, o centriolo da segunda divizão hetero-polar.

Este fato foi tambem verificado por HARTMANN nos microgámetas do proteozoma e por ROSENBUSCH em diversos tripanozómidas.

Em continuação ás fórmas precedentes encontram-se no intestino quilifico organismos mais dezenvolvidos, alguns piriformes, com extremidade afilada, pela qual emerje o flajelo, e o lado oposto mais ou menos rombo, ás vezes regularmente arredondado (Est. 13, Fig. 12, 21 e 22). Nestas fórmas, óra existe flajelo livre, óra só é encontrada a porção intracelular do flajelo; nellas a estrutura é semelhante á descrita para os organismos esfericos sendo, porém, mais acentuadas algumas das minucias estruturais que referimos. Assim é que na membrana do nucleo frequentemente são vistos os granulos cromaticos, o mais das vezes em numero de 8 (Est. 13, Fig. 21) e o blefaroplasto aprezenta estrutura nuclear mais bem caraterizada (Est. 13, Fig. 12 e 21). Nesta faze é comum observar o fenomeno de divizão prévia do nucleo, referido nos flajelados do sangue, sendo demonstrativo deste fato um dos nossos dezenhos (Est. 13, Fig. 22) no qual o cariozoma do nucleo principal mostra dois centriolos, o mesmo acontecendo ao cariozoma do nucleo-blefaroplasto. Neste os dois centriolos se acham ligados por filamento central, que é formado pela divizão do centriolo.

A pozição do blefaroplasto é aqui variavel, sendo elle encontrado quazi sempre atraz do nucleo, afastado da extremidade ponte aguda (Est. 13, Fig. 21 e 22) podendo tambem ser visto ao lado do nucleo principal.

Simultaneamente com os ultimos organismos vêm-se outros menores, geralmente aflajelados (Est. 11, Fig. 58—59) ou só aprezentando a baze do aparelho flajelar, de fórma ovoide, com a estrutura do nucleo e a do

von feinen Linienbälkchen durchsetzt und von einer regelmässig begrenzten Membran umschlossen ist. Diese Membran erscheint bald homogen, bald zeigt sie kleine Chromatin-Granula, die stärker gefärbt und regelmässig, in gleichen Abständen angeordnet sind. (Taf. 13, Fig. 13). An diese Körnchen schliessen sich die Lininfäden, welche vom Caryosom ausgehen.

Der Kern, den ich so beschrieben habe, wie er in der Regel bei den beobachteten Formen auftritt, zeigt oft eine Abänderung; dieselbe bezieht sich hauptsächlich auf die Menge der chromatischen Substanz, welche in der Kernsaftzone enthalten ist; hier tritt das Chromatin manchmal reichlicher auf, sodass es bei einigen Formen an der Innenfläche der Kernmembran ein feines Netzwerk bildet. Es sind dies Bilder, welche (nach der Theorie von HARTMANN) auf zyklische Veränderungen des Caryosoms zurückzuführen sind (Abgabe von Chromatin in die Kernsaftzone) und sich mit ähnlichen Erscheinungen bei der *Amoeba tetragena* vergleichen lassen. Ber Blepharoplast zeigt hier Aehnlichkeit mit dem Bilde, welches von Blutflagellaten beschrieben wurde; er enthält ein grosses Caryosom, welches fast immer von einem dicken und gekrümmten Chromatinbalken gebildet ist (Taf. 13, Fig. 9 und 14), welcher bei jungen geissellosen Formen mit der Konkavität dem Kerne zugewandt ist. Das Caryosom des Blepharoplasten ist von einer hellen Zone umgeben, in welcher weder Chromatin noch Linin sichtbar sind. Es ist dies seine Kernsaftzone, welche durch eine feine, nicht sehr regelmässig konturierte, Membran begrenzt wird.

In dieser und den darauffolgenden Phasen des exogenen Entwicklungszyklus des Flagellaten finden sich, in nach GIEMSA gefärbten Präparaten, intensiv rot gefärbte Granulationen von wechselnder Grösse im Innern des Plasma. Sie entsprechen den von ROSENBUSCH in den Kulturen von *Hämoproteus* beschriebenen und scheinen aus Volutin (SWELLENGREBEL) zu bestehen.

Die Bildung des Geisselapparates beginnt häufig bei diesen runden Formen; man findet dann (Taf. 13, Fig. 9, 11 und 12) als Resultat der heteropolaren Teilung des Blepharoplas-

blefaroplasto identicas á referida. Destas fórmas encontram-se frequentemente aglomerações consideraveis, o que indica, nellas, ativa multiplicação.

Divizão dos flajelados no intestino quilifico.

Em qualquer das fórmas descritas do parazito, a multiplicação, por cizão lonjitudinal, na primeira parte do intestino médio, é muito ativa, sendo encontrados organismos com nucleos e blefaroplastos multiplos, óra com 2 blefaroplastos e 1 só nucleo principal, fato o mais frequente; óra, ao contrario, com 2 nucleos principais e 1 só blefaroplasto; óra, finalmente, com igualdade das duas especies de nucleos. Tambem se observam estadios varios da divizão celular, sendo frequente, nas grandes aglomerações de fórmas esfericas ou ovoides, acharem-se os parazitos ligados entre si por meio de delgadas laminas de plasma. Variantes multiplas de aspeto são ainda vistas, relativas ao nucleo principal e ao blefaroplasto, á prezença ou auzencia de flajelos. Assim é que frequentes vezes vêm-se fórmas com um só nucleo principal e 2 blefaroplastos, cada um destes possuindo um aparelho flajelar. Parece, da maioria de aspetos observados, ser a divizão do nucleo principal quazi sempre precedida pela do blefaroplasto; aliaz nas figuras de mitoze que surpreendémos, o mais das vezes a mitoze do blefaroplasto se acha em faze mais adiantada que a do nucleo principal.

Os preparados fixados secos e córados pelo GIEMSA, nada ensinam dos fenomenos intimos dos 2 nucleos, pelo que, nossas pesquizas sobre este ponto foram feitas com o metodo de ROSENBUSCH. Não nos foi possivel, por emquanto, surpreender todas as fazes da divizão dos nucleos principal e locomotor; procedemos atualmente a novos estudos, cujos rezultados serão referidos mais tarde. Alguns estadios que observámos da mitoze do nucleo principal e do blefaroplasto são muito interessantes, merecendo expozição minucioza. As Figs. 83—86 da Est. 13 reprezentam fazes terminais de mitoze. Nestas mesmas figuras observam-se as telofazes

ten, einen Faserkegel, die Centralspindel, welche den Rhizoplasten umgiebt; erstere zeigt an ihrer Spitze ein Chromatinkorn, das Basalkörperchen, von welchem die Geissel entspringt.

Manchmal haben diese runden Formen keine freie Geissel, sondern nur den intracellulären Teil derselben; doch findet sich bei einem Teil der Organismen eine freie Geissel, die nicht selten eine bedeutende Länge erreicht.

An dieser Geissel, gewöhnlich an ihrem Ende, sieht man häufig ein zweites Chromatinkorn, welches kleiner ist, als das Basalkörperchen, demselben aber in der Färbung gleicht.

Das Vorkommen eines solchen Körperchens entspricht der Bildungsweise der Geissel, indem es nach der Theorie von SCHAUDINN das Centriol einer zweiten heteropolaren Teilung darstellt. Diese Auffassung ist ja auch von HARTMANN für die Mikrogameten von *Proteosoma* und von ROSENBUSCH für verschiedene Trypanosomiden begründet worden.

Einer weiteren Entwicklung der beschriebenen Form entsprechend, findet man im Chylusdarme Organismen, die zum Teil birnförmig sind; vom zugespitzten Ende entspringt die Geissel, während das andere mehr oder weniger stumpf und nicht selten regelmässig gerundet erscheint (Tafel 13, Fig. 12, 21 u. 22). Bei diesen Formen findet sich bald eine freie Geissel, bald nur der intracelluläre Teil einer solchen; ihre Struktur gleicht derjenigen der sphärischen Organismen, doch sind einige der beschriebenen Strukturdetails deutlicher ausgeprägt; so sieht man in der Kernmembran häufig Chromatingranula, gewöhnlich deren acht, (Taf. 13, Fig. 21), und der Blepharoplast zeigt eine deutlichere Kernstruktur (Taf. 13, Fig. 12, u. 21). In dieser Phase beobachtet man häufig die, schon von den Blutflagellaten bekannte, vorläufige Kernteilung, wie dies eine meiner Zeichnungen (Tafel 13, Fig. 22) darstellt, in welcher das Caryosom des Hauptkernes zwei Centriolen zeigt, wie es auch bei den Caryosom des Blepharoplastkernes der Fall ist. Bei diesem finden sich die Centriolen an beiden Enden verbunden durch die Fibrille der Centralfaser, welche durch Teilung des Centriols selbst gebildet wird.

Auch hier ist die Lage des Blepharoplasten

de divizão do blefaroplasto e do nucleo principal. No blefaroplasto, ligando as duas metades da figura, permanece o filamento central do fuzo, cujas extremidades prendem-se aos dois centriolos colocados nos centros dos cariozomas. Num destes ha divizão precoce do centriolo, destinada, talvez, á formação do aparelho flajelar ou á nova mitoze do blefaroplasto. A mitoze do nucleo principal se acha em estadio mais atrazado, vendo-se as duas metades da figura ligadas ainda pelo fuzo central da divizão *(Centralspindel)* em cujo centro existe o filamento central *(Centralfaser)*, que tem nas extremidades os dois centriolos. Os novos cariozomas já se acham organizados, e tambem as zonas de suco nuclear, com as membranas envolventes. Fatos similares vêm demonstrados á Fig. 10 da Est. 13. A Fig. 83 da Est. 13 reprezenta a faze terminal da mitoze do nucleo principal, achando-se os 2 nucleos filhos ligados pelo *Centralspindel* (fuzo central e filamento). As substancias dos dois cariozomas aprezentam-se aí dispostas em dois cones, a cujos apices se acham prezas as extremidades do fuzo. Nas Figs. 84 e 85 da Est. 13 vêm-se ainda fazes terminais de mitozes, sendo de notar aí a divizão do centriolo de alguns blefaroplastos.

Estas observações são relativas ás fórmas esfericas aflajeladas, ficando para mais tarde a referencia de fenomenos similares que temos observado em fórmas flajeladas, quer nas fórmas novas, quer em organismos critidiais completamente dezenvolvidas.

Devemos salientar aqui a evidencia do papel do centriolo nas mitozes do nucleo principal e do blefaroplasto, atuando elle, cuja divizão precede sempre á das outras partes do nucleo, como o orgão orientador do fenomeno. E' esta nova demonstração, bem clara, da teoria de v. PROWAZEK e HARTMANN, para quem o centriolo do cariozoma reprezenta, na mitoze dos protozoarios, função identica á do centriolo do centrozomio nas celulas dos metazoarios. Aliaz, observações multiplas sobre fenomenos de divizão nuclear, em outros grupos de protozoarios, fazem-nos absolutamente convencido das idéas daquelles inves-

eine wechselnde; gewöhnlich findet man ihn hinter dem Nucleus, entfernt vom zugespitztem Ende (Taf. 13, Fig. 21 u. 22); doch kann er auch neben dem Hauptkerne getroffen werden.

Gleichzeitig mit den letztbeschriebenen Formen findet man andere kleinere und gewöhnlich geissellose (Taf. 13, Fig. 58-59) oder nur die Basis derselben zeigende, von ovaler Form und mit, wie oben beschrieben, gebildetem Kerne und Blepharoplasten. Dieselben finden sich oft in beträchtlichen Gruppen, was eine rasche Vermehrung andeutet.

Teilung der Flagellaten im Chylusdarme.

Bei allen den oben beschriebenen Parasitenformen ist die Vermehrung durch Längsteilung im Anfangsteile des Mitteldarmes sehr lebhaft, wobei man Exemplare mit mehrfachen Blepharoplasten und Kernen findet; man trifft entweder 2 Blepharoplasten und einen Hauptkern, was am häufigsten vorkommt, oder im Gegenteil 2 Hauptkerne neben einem Blepharoplasten oder endlich beide Kernarten in der gleichen Zahl. Auch beobachtet man verschiedene Stadien der Zellteilung, wobei man in den grossen Haufen von runden und eiförmigen Formen nicht selten durch dünne Plasmenlamellen verbundene Parasiten antrifft. Auch finden sich verschiedene Kombinationen in Beziehung auf Hauptkern und Blepharoplast und das Fehlen oder Vorhandensein von Geisseln.

So findet man häufig Formen mit einem Hauptkern und 2 Blepharoplasten, von denen jeder einen Geisselapparat besitzt. Nach der Mehrzahl der Beobachtungen scheint die Teilung des Hauptkernes gewöhnlich derjenigen des Blepharoplasten zu folgen; übrigens findet sich auch bei den Teilungsphasen, die ich beobachtete, gewöhnlich die Mitose des Blepharoplasten weiter vorgerückt, als diejenige des Hauptkernes.

Trocken fixierte und nach GIEMSA gefärbte Präparate geben über die Einzelheiten der Kernteilung keinen Aufschluss, weshalb ich meine diesbezüglichen Untersuchungen nach ROSENBUSCH'scher Methode anstellte. Bis jetzt gelang es mir nicht, alle Phasen der Teilung

tigadores. Por outro lado, a mitoze do blefaroplasto, que neste parazito aprezenta aspeto de grande nitidez e regularidade, vem confirmar ainda a natureza nuclear daquelle orgão, cuja estrutura, na condição dinamica, quanto na estatica, é inteiramente comparavel á do nucleo principal.

Os nossos rezultados estão, por conseguinte, em pleno acordo com os novos achados de ROSENBUSCH sobre outros tripanozómidas e confirmam a interpretação sobre as condições do nucleo da celula dos tripanozómidas dada por SCHAUDINN e seus sucessores.

Flajelados da porção posterior ou intestiniforme do intestino médio do Conorhinus.

Ainda na porção quilifica do intestino médio, 25 horas apoz a injestão de sangue, encontram-se novas fórmas parazitarias que reprezentam estados evolutivos mais adiantados das fórmas descritas. Aí, porém, tais organismos são raros, parecendo que pouco tempo permanecem, apoz sua formação, neste segmento do tubo dijestivo, depressa passando para a porção cilindrica posterior, onde são vistos em grande numero.

Na porção intestiniforme do intestino médio, desde a 15.ª hora, encontra-se, como dissemos, liquido negro, que reprezenta faze mais adiantada da dijestão do sangue; os parazitos, porém, só aparecem neste liquido depois da 25.ª hora e aí, devido á rapida multiplicação, tornam-se numerozissimos, permanecendo indefinidamente vivos, embóra deixadas as larvas sem alimentação, infetante ou não, durante longos dias.

Estes flajelados são de morfolojia inteiramente identica á dos que existem no intestino de conorrinos adultos, colhidos nas zonas infetadas. Tambem nestes, privados de alimentação por muito tempo, os flajelados permanecem em plena atividade, mostrando mesmo fenomenos de multiplicação.

Os flajelados desta parte do intestino médio aprezentam grande variedade de aspetos, predominando, porém, os organismos critidiformes adultos Fig. 13—20, Est. 13. Estes

des Haupt- und lokomotorischen Kernes aufzufinden; doch bin ich mit weiteren Beobachtungen beschäftigt, über deren Resultate später berichtet werden soll. Einige Stadien der Mitose des Hauptkernes und Blepharoplasten, die ich beobachtete, sind sehr interessant und verdienen eine nähere Beschreibung. Die Fig. 83—86 der Taf. 12 zeigen die Endstadien der Mitose; in denselben Figuren sieht man die Telophasen der Teilung des Blepharoplasten und Hauptkernes. Die beiden Hälften der Figur verbindend, ist im Blepharoplasten die Centralfaser der Spindel erhalten und ihre Enden verbinden die beiden Centriolen, welche im Centrum der Caryosome liegen. Bei einem derselben bemerkt man eine vorzeitige Teilung des Centriols, die scheinbar für die Bildung des Geisselapparates oder eine neue Mitose des Blepharoplasten bestimmt ist. Die Mitose des Hauptkernes ist weniger vorgerückt, indem die Hälften der Teilungsfigur noch durch die Centralspindel und die, in der Mitte gelegene, Centralfaser mit den an beiden Enden gelegenen Centriolen verbunden sind. Die neuen Caryosomen, die Kernzonen und die umhüllenden Membranen sind bereits gebildet. Aehnliche Vorgänge erkennt man in der Fig. 10, Taf. 13. Die Fig. 13 der Taf. 12 zeigt das Ende der Mitose des Hauptkernes, wobei die beiden Tochterkerne durch Centralspindel und -Faser verbunden sind. Die Substanz der beiden Caryosomen erscheint hier in 2 Kegel angeordnet, an deren Spitzen sich die Enden der Spindel anlegen. In den Fig. 84 und 85 der Taf. 12 sieht man auch noch Endstadien der Mitose, wobei man die Teilung der Centriolen einiger Blepharoplaste erkennt.

Diese Beobachtungen beziehen sich auf die Mitose der runden, geissellosen Formen; auf eine spätere Zeit verschiebe ich den Bericht über ähnliche Erscheinungen, die ich an geisseltragenden Formen und zwar teils an jungen Stadien, teils an voll entwickelten Crithidienformen, beobachtet habe.

Ich muss hier die Rolle der Centriolen bei den Mitosen des Kernes und des Blepharoplasten hervorheben, welche sie unzweifelhaft als orientierende Organe des Teilungsphänomens spielen, indem ihre Teilung immer derjenigen

são parazitos alongados, de largura variavel, com ambas as extremidades ponteagudas, aprezentando, na coloração pelo metodo de ROSENBUSCH, plasma alveolar. A extremidade anterior prolonga-se em longo filamento delgado; a posterior, óra termina abruptamente em ponta aguda, óra se mostra arredondada, óra, finalmente, é tambem longa e aguda, menos delgada que a oposta.

O nucleo aprezenta estrutura semelhante á das fórmas anteriores: um cariozoma, em cujo centro é muitas vezes apreciavel centriolo, zona de suco nuclear, atravessada de finas e regulares trabeculas de linina, membrana onde, de regra, é vizivel a diferenciação de 8 ou mais granulos de cromatina. Nas fórmas longas o nucleo principal acha-se situado mais ou menos no meio do eixo lonjitudinal do parazito.

O blefaroplasto mostra, ainda aqui, a nitida estrutura nuclear já descrita. Está situado, óra para frente do nucleo principal, sempre em pozição lateral, nunca no eixo lonjitudinal da celula, óra ao lado do nucleo principal. Nunca, nos flajelados desta zona do tubo dijestivo, é visto o blefaroplasto atraz do nucleo principal.

A baze do aparelho flajelar não oferece neste cazo outras minucias além das referidas; nestes organismos, porém, existe a membrana ondulante, colocada sobre todo o prolongamento delgado anterior da celula e aprezentando, de regra, muitas ondulações.

Além destes flajelados, encontram-se outros, piriformes ou esfericos, nos quais existe prolongamento plasmatico muito fino, munido de membrana ondulante e de flajelo; nestes o flajelo livre é, ás vezes, muito longo, em grande desproporção com as dimensões da celula (Est. 13, Fig. 87).

Estadios intermediarios multiplos, no ponto de vista do aspeto e da fórma geral, existem entre os organismos esfericos pequenos e as fórmas adultas longas de critidias; todos os parazitos, porém, encontrados neste segmento do intestino médio, aprezentam-se munidos de flajelo.

der anderen Kernbestandteile vorangeht. Es bildet dies einen deutlichen Beweis zu Gunsten der Theorie von v. PROWAZEK und HARTMANN, nach welcher das Centriol der Caryosome bei der Mitose der Protozoen dieselbe Funktion hat, wie die Centrosome der Metazoenzelle. Uebrigens haben mich auch vielfältige Beobachtungen über die Kernteilung bei anderen Protozoengruppen vollständig von der Richtigkeit ihrer Anschauungen überzeugt. Auf der anderen Seite dient die, bei diesen Parasiten sehr deutliche und regelmässige, Mitose des Blepharoplasten zur weiteren Bestätigung der Kernnatur dieses Organes, dessen Struktur, ebensowohl im aktiven, wie im Ruhezustande vollständig derjenigen des Hauptkernes gleicht. Meine Resultate stehen somit in vollständiger Uebereinstimmung mit den neuen Befunden von ROSENBUSCH an anderen Trypanosomen und bestätigen die Auffassung der Kernverhältnisse der Trypanosomenzelle, wie sie von SCHAUDINN und seinen Nachfolgern vertreten wird.

Flagellaten des hinteren oder cylindrischen Teiles des Mitteldarmes des Conorhinus.

Noch im vorderen Teile des Mitteldarmes findet man 25 Stunden nach der Blutaufnahme weitere Parasitenformen, welche vorgerückteren Entwicklungsstadien der bereits beschriebenen Formen entsprechen. Doch sind daselbst solche Formen selten und es scheint, dass sie nach ihrer Bildung nur kurze Zeit in diesem Darmabschnitt verbleiben, um bald in den hinteren cylindrischen Teil überzutreten, woselbst sie in grosser Zahl zu finden sind. Im cylindrischen Teile des Mitteldarmes findet man, wie gesagt, von der 15. Stunde an eine schwarze Flüssigkeit, welche das Produkt einer vorgeschritteneren Verdauung des Blutes darstellt; die Parasiten erscheinen jedoch in dieser Flüssigkeit erst nach 25 Stunden und werden hier in Folge einer rapiden Vermehrung äusserst zahlreich, wobei sie sich unbeschränkte Zeit erhalten, trotzdem man die Larven während vieler Tage ohne infektiöse oder anderweitige Nahrung belässt. Diese Flagellaten gleichen in ihrer Morphologie vollständig denjenigen im Darme erwachsener

Nos preparados fixados secos e córados pelo GIEMSA ha só que referir a prezença de abundantes granulos vermelhos, irregularmente espalhados pelo plasma e que são, provavelmente, rezultantes do metabolismo celular. (Fig. 62-69, Est. 11)

Rapida multiplicação experimenta o parazito nesta faze evolutiva, sendo, por isso, encontradas grandes aglomerações de fórmas, ligadas entre si por delgadas pontes plasmaticas, vendo-se tambem critidias plurinucleadas e divizões celulares incompletas. Os flajelados adultos dividem-se lonjitudinalmente, aprezentando diversos aspetos, desde a divizão lonjitudinal binaria, a mais comum, até a divizão lonjitudinal multipla, na qual fórmas aberrantes de critidias, muito volumozas, mostram muitos nucleos.

Os organismos descritos permanecem por tempo indeterminado no intestino e são encontrados nos escrementos, em pequeno numero. Não conhecemos qualquer outra faze que possa ser interpretada como a continuação desta, apezar das numerozas pesquizas realizadas.

Em todos os insetos experimentados, sem uma unica exceção, os fatos passam-se conforme acabámos de referir; algumas experiencias, porém, deixam observar ainda outros fenomenos diferentes que, embóra não esclarecidos de modo satisfatorio, devem ser expostos desde já, visto reprezentarem, a nosso ver, fatos de grande importancia na biolojia do parazito:

Das larvas experimentalmente infetadas algumas mostram, ao lado dos organismos descritos, outros de morfolojia completamente diversa. Assim é que, de 20 a 30 hóras apoz a injestão de sangue, encontrámos em muitas larvas organismos esfericos (Est. 12, Fig. 78—82) munidos de camada periferica condensada, semelhante a membrana, e possuindo grande nucleo que ocupa talvez 2 terços da celula. Este nucleo aprezenta, óra na periferia, óra no centro, um corpusculo de cromatina intensamente córado, com o aspeto de blefaroplasto; este é visto ainda separado do nucleo, colocado na superficie do organismo e fre-

*Conorhinus*wanzen, welche in infizierten Zonen gesammelt wurden. Auch bei diesen bleiben die Flagellaten in voller Tätigkeit, selbst bei lang andauerndem Nahrungsmangel, und zeigen sogar Vermehrungserscheinungen.

In diesem Teile des Mitteldarmes weisen die Flagellaten sehr verschiedene Formen auf, unter denen jedoch die erwachsenen Organismen vom Crithidiatypus vorwiegen. Diese Parasiten sind länglich, von wechselnder Breite, an beiden Enden zugespitzt und zeigen bei der Färbung nach ROSENBUSCH ein alveoläres Protoplasma. Das Vorderende verlängert sich in einen langen dünnen Faden; das hintere endet plötzlich mit einer scharfen Spitze oder zeigt sich abgerundet; endlich kann es auch lang und zugespitzt, aber weniger schlank als das entgegengesetzte, gefunden werden.

Der Kern zeigt eine ähnliche Struktur, wie bei den früher beschriebenen Formen, nämlich: ein Caryosom, in dessen Zentrum man häufig ein Centriol erkennt, eine Kernsaftzone, die von feinen, regelmässigen Linin-Bälkchen durchsetzt ist und eine Kernmembran, von der in der Regel 8 oder mehr Chromatinkörner sich abheben; bei den längeren Formen befindet sich der Hauptkern ungefähr in der Mitte der Längsachse des Parasiten.

Der Blepharoplast zeigt auch hier die bereits beschriebene, deutliche Kernstruktur. Er befindet sich bald zur Seite des Hauptkernes, bald vor demselben, aber immer in seitlicher Lage, niemals in der Längsachse der Zelle; dagegen wird bei den Flagellaten aus diesem Teile des Darmtraktes der Blepharoplast niemals hinter dem Haupkerne gefunden.

Die Basis des Geisselapparates zeigt nur die bereits beschriebenen Details; dagegen findet man bei diesen Organismen eine undulierende Membran, welche dem ganzen dünnen Fortsatze des Vorderendes der Zelle folgt und gewöhnlich viele Wellen zeigt; ausser diesen länglichen Flagellaten findet man andere von Birn- oder Kugelform, bei welchen ein sehr dünner, mit Geissel und undulierender Membran versehener, Plasmavorsatz vorkömmt; bei diesen ist die freie Geissel nicht selten sehr lang und ganz ausser Verhältnis mit den Dimensionen der Zelle (Taf. 2, Fig. 87).

quentemente aprezenta-se bilobado, como se fôra o rezultado da união de 2 corpusculos identicos (Est. 12, Fig. 80—81).

A quantidade destas fórmas era muito variavel, sendo encontradas com abundancia em todas as larvas alimentadas em certos animais e raras ou auzentes nas alimentadas em outros. Do determinismo do aparecimento destes organismos nada sabemos ainda, esperando esclarecel-o bem depressa; é, porém, de notar a frequencia com que os encontrámos nas larvas alimentadas em *Callithrix*, com infeção antiga, ao passo que nas alimentadas em cobaias, mesmo infetadas desde muito, com numerozos parazitos, rarissimas vezes observámos aquellas fórmas. Infelizmente só uzámos, nas pesquizas deste ponto, a fixação a seco e a coloração pelo metodo de GIEMSA, o que explica, em parte, a dificuldade na interpretação dos aspetos observados.

Importantes são ainda as fórmas de esquizogonia que observámos em 3 experiencias, de 140 a 150 horas apoz a refeição, no sangue, em via de dijestão, contido na porção quilifica do intestino médio. Estas se aprezentam constituidas de 8 pequenos organismos mais ou menos ovoides, prezos por massa de plasma central (Est. 12, Fig. 89). Em cada existe um nucleo longo e numa das extremidades um corpusculo de cromatina mais intensamente córado, com o aspeto de blefaroplasto. Aquellas unidades da fórma esquizogonica são vistas, no mesmo material, já separadas (Est. 12, Fig. 90—97), óra em aglomerações, óra izoladas; mostram nitidamente um nucleo principal e um blefaroplasto, tendo, o primeiro, a cromatina, ás vezes, disposta em longa fita e outras já condensada em corpo ovoide. O blefaroplasto, óra está unido ao nucleo, numa das extremidades (Est. 12, Fig. 91), óra delle afastado, ligado ou não por filamento cromatico (Est. 12, Fig. 95—97). E' aspeto estrutural bem tipico dos tripanozómidas, similar, em alguns pontos, ao que se observa nas unidades da esquizogonia no pulmão e tambem em alguns estadios jovens do flajelado, no sangue. Não é possivel duvidar de que estes organismos reprezentam

Zwischen den kleinen runden und den erwachsenen langen crithidienartigen Formen finden sich vielfache Uebergänge in der allgemeinen Gestalt; doch zeigen alle parasitären Formen aus diesem Teile des Mitteldarmes eine Geissel.

Bei trocken fixierten und mit GIEMSA gefärbten Präparaten ist noch das Vorkommen zahlreicher roter Körnchen zu verzeichnen; dieselben sind unregelmässig im Plasma verteilt und müssen wahrscheinlich als Produkte des Stoffwechsels aufgefasst werden (Fig. 62-69, Taf. 11).

In dieser Entwicklungsphase des Parasiten findet eine rasche Teilung statt, weshalb man oft eine grosse Anhäufung von Formen findet, welche unter sich durch feine Plasmabrücken verbunden sind; auch findet man Crithidienformen mit mehreren Kernen und unvollständige Zellteilungen. Die erwachsenen Flagellaten teilen sich der Länge nach und bieten verschiedene Bilder, von der einfachen longitudinalen Zweiteilung bis zur vielfachen Längsteilung, bei welcher aberrante Crithidienformen von grossem Volumen mehrfache Kerne aufweisen.

Die beschriebenen Organismen verharren unbestimmte Zeit im Darme und werden in geringer Zahl in den Exkrementen gefunden. Trotz zahlreicher Untersuchungen kenne ich keine andere Phase, welche als ein weiterer Zustand aufgefasst werden könnte.

Bei sämtlichen untersuchten Insekten beobachteten wir ausnahmslos die soeben beschriebene Reihe von Erscheinungen; doch wurden in einigen Versuchen noch andere Vorkommnisse beobachtet, welche zwar noch nicht genügend aufgeklärt sind, aber doch hier aufgeführt werden müssen, da sie meiner Ansicht nach wichtige Erscheinungen in der Biologie des Parasiten darstellen.

Bei künstlich infizierten Larven zeigen einige neben beschriebenen Formen andere von ganz verschiedener Morphologie. So finden wir 20 bis 30 Stunden nach der Blutaufnahme bei vielen Larven runde Organismen (Taf. 12, Fig. 78-82), die eine verdichtete periphere Schicht aufweisen, welche einer Membran gleicht, und ausserdem einen grossen Kern besitzen,

faze no ciclo do flajelado no inseto, restando apenas conhecer melhor as fazes precedentes e as posteriores a esta. Acreditamos, impressionado pela semelhança dos aspetos cromaticos, que as fórmas de esquizogonia reprezentam a divizão dos organismos esfericos a que nos referimos, as quais seriam, talvez, ooquinetos, rezultantes de fecundação não surpreendida.

Formas parazitarias na cavidade geral do inseto.

Encontrámos fórmas do flajelado, em 2 cazos, na cavidade geral do *Conorhinus*. Estes haviam sido colhidos em habitações infetadas e estavam sem sugar qualquer vertebrado desde muitos dias, não aprezentando vestijio de sangue no intestino quilifico, tendo, porém, no intestino posterior e nos escrementos grande numero de fórmas critidiais.

Nas observações sistematicamente realizadas não conseguimos ainda surpreender parazitos na cavidade geral, pelo que pensámos ser a permanencia delles ali muito tranzitoria, depressa passando ás glandulas salivares.

As fórmas vistas nas duas experiencias são organismos aprezentando longa faixa de cromatina no nucleo e grande blefaroplasto oval, óra situado na extremidade posterior, óra ainda distante desta; possuem membrana ondulante e flajelo livre e aprezentam organização morfologica muito semelhante á das fórmas encontradas nas glandulas salivares (Est. 11, Fig. 71-73).

Fórmas parazitarias encontradas nas glandulas salivares do Conorhinus.

Em 3 experiencias encontrámos, em «*frottis*» de glandulas salivares de conorrinos, fórmas de evolução do *Schizotrypanum cruzi*, as quais reprezentam, sem duvida, os organismos que são inoculados no vertebrado.

Uma das verificações foi feita em inseto adulto que havia picado um *Callithrix* infetado, 12 dias antes. Nesta, em exame a fresco do material das glandulas salivares (glandulas

welcher vielleicht zwei Drittel der Zelle ausfüllt. Dieser Kern zeigt bald im Zentrum, bald an der Peripherie ein intensiv gefärbtes Chromatinkörperchen vom Aussehen eines Blepharoplasten; dasselbe wird auch, vom Kerne getrennt, an der Oberfläche des Organismus gefunden und ist ausserdem oft zweilappig, als ob es aus der Vereinigung zweier gleichartigen Körperchen enstanden wäre (Tafel 12, Fig. 80—81).

Die Zahl dieser Formen war sehr schwankend; ich fand sie in grosser Zahl in allen Larven, welche an bestimmten Tieren gefüttert wurden, dagegen selten oder auch gar nicht bei solchen, deren Nahrung von anderen Tieren stammte. Ueber die Ursache des Auftretens dieses Organismus ist noch nichts bekannt, doch hoffe ich, dieselbe baldigst aufzuklären; jedenfalls ist die Häufigkeit hervorzuheben, mit welcher ich ihn bei den an seit langem infizierten *Callithrix*-Aeffchen gefütterten Larven gefunden habe, während bei andern, mit dem Blute von Meerschweinchen ernährten trotz lange dauernder Infektion und zahlreichen Parasiten im peripherischen Blute diese Formen nur sehr selten beobachtet wurden. Leider benutzte ich bei den diesbezüglichen Untersuchungen nur die trockene Fixation und Färbung nach GIEMSA, was einigermassen die Schwierigkeit der Deutung der beobachteten Bilder erklärt.

Von Wichtigkeit sind auch die Schizogonieformen, welche ich in drei Versuchen, 140 bis 150 Stunden nach der Blutaufnahme, in teilweise verdautem Blute auffand, welches im vorderen Teile des Mitteldarmes enthalten war. Diese zeigen sich aus acht kleinen, nahezu eiförmigen Organismen gebildet, welche durch eine zentrale Plasmamasse zusammenhängen (Taf. 12, Fig. 89); in jedem derselben findet sich ein länglicher Kern und an einem seiner Enden ein intensiver gefärbtes Chromatinkörperchen vom Aussehen eines Blepharoplasten. Die einzelnen Individuen der Schizogonieform werden in demselben Materiale auch getrennt (Taf. 12, Fig. 90—97), bald einzeln, bald in Haufen, gefunden und lassen einen Hauptkern und Blepharoplasten deutlich erkennen; ersterer zeigt das Chromatin manchmal in langer Band-

principais) observámos flagelados com movimentos ativos semelhantes aos dos parazitos vistos no liquido da cavidade geral. Em «*frottis*» fixados a seco e córados pelo metodo de GIEMSA, observámos 2 fórmas de aspetos bem distintos. Uma dellas aprezenta-se como organismos compridos e delgados, tendo a cromatina nuclear disposta ainda em faixa lonjitudinal, ocupando mais ou menos $^1/_4$ do comprimento da celula; o blefaroplasto aprezenta-se como um grande corpusculo cromatico, óra situado atraz do nucleo e deste pouco distante (Est. 11, Fig. 74 e 75) óra colocado na extremidade posterior da celula (Est. 12, Fig. 76). Em algumas fórmas não vimos flagelo nem membrana ondulante (Est. 12, Fig. 76) o que atribuimos a defeito de cóloração, porquanto em outras observações quazi todos os parazitos mostraram membrana ondulante, flajelo aderente e flajelo livre (Est. 11, Fig. 74 e 75).

A segunda fórma observada era constituida por organismo largo, possuindo blefaroplasto muito menor que o da fórma precedente e situado exatamente na extremidade posterior; um nucleo principal mais ou menos ovoide, com a cromatina de aspeto muito diverso do das fórmas delgadas. Este organismo, nas nossas observações, era muito mais raro e não observámos correspondentes delle na cavidade geral (Est. 12, Fig. 77.)

As outras duas observações de flajelados nas glandulas salivares foram feitas em insetos colhidos nas habitações infetadas. Em tal cazo, a maior quantidade de hemipteros, embora aprezentando flajelados no intestino posterior, nada mostram nas glandulas salivares; certo numero delles, porém, em relação centezimal não determinada, acha-se infetado e são infetantes, sendo vistos nas glandulas salivares os parazitos com a morfolojia descrita. Esta observação, aliaz, é confirmada nas tentativas de infeção por picada de conorrinos colhidos em rezidencias humanas, nas quais só pequena proporção de insetos é infetante.

---

form und manchmal zu einem eiförmigen Körper verdichtet. Der Blepharoplast ist bald an einem Ende des Nucleus gelegen und mit diesem verbunden (Taf. 12, Fig. 91), bald von diesem entfernt, getrennt oder durch einen Chromatinfaden verbunden (Taf. 12, Fig. 95-97). Es ist dies ein typisches Strukturbild der Trypanosomen, das in manchen Punkten demjenigen gleicht, welches man an den einzelnen Individuen der Schizogonieformen der Lunge und den jugendlichen Blutflagellaten beobachtet. Man kann nicht bezweifeln, dass diese Formen eine Phase der Entwicklung des Flagellaten im Insekte darstellen, wobei uns nur eine bessere Kenntnis der vorhergehenden und nachfolgenden Stadien fehlt. Unter dem Eindruck der Uebereinstimmung der chromatischen Bilder glaube ich, dass die Schizogonieformen die Teilung der erwähnten Formen darstellen, welche vielleicht Ookineten sind, die aus einer, nicht im Augenblicke des Bestehens beobachteten, Befruchtung hervorgehen.

Parasitäre Formen aus der Leibeshöhle des Insektes.

Ich habe zwei mal Flagellaten in der Leibeshöhle von Exemplaren von *Conorhinus* gesammelt, welche in infizierten Wohnungen gefunden waren. Sie hatten seit langer Zeit an keinem Wirbeltiere gesaugt und zeigten keine Spur von Blut im Chylusdarm, dagegen im Enddarm und in den Exkrementen eine grosse Zahl von Crithidienformen.

Bei systematisch angestellten Beobachtungen gelang es mir bisher nicht, den Parasiten in der Leibeshöhle zu treffen; ich glaube daher, dass er sich daselbst nur ganz vorübergehend aufhält, indem er sehr bald in die Speicheldrüsen übertritt.

Die Organismen, welche bei den 2 Versuchen gefunden wurden, zeigen einen langen Chromatinstreifen im Kerne und einen grossen ovalen Blepharoplasten, der bald am Hinterende, bald von demselben entfernt liegt; sie besitzen eine freie Geissel und eine undulierende Membran und zeigen eine sehr ähnliche Bildung, wie die Formen, die in den Speicheldrüsen gefunden werden (Fig. 71—73, Taf. 11).

Cultura artificial do parazito.

O *Schrizotypanum cruzi* é facilmente cultivavel em agar-sangue, segundo o metodo de NOVY e MAC NEAL. Procedemos do modo seguinte:

Sangrámos coelhos no coração, — processo melhor que o da sangria nas carotidas, podendo ser retirados, em cada sessão, até 40 c c.^{3} de sangue, sem sacrificio do animal. — Misturámos partes iguais de sangue desfibrinado com agar fundido e mantido a 50°. Na agua de condensação, geralmente abundante, fizémos a sementeira.

Exames sistematicos mostram as primeiras modificações do flajelado, desde a sexta hora, sendo aqui, como no tubo dijestivo do inséto, fenomenos iniciais a migração do nucleo blefaroplasto para as proximidades do nucleo principal, a perda da membrana ondulante e do flajelo e, por ultimo, o arredondamento do parazito (Est. 13, Fig. 23a-23b). Em seguida dá-se rapida multiplicação, de modo que, apoz 20 hóras, começam a aparecer na cultura novos organismos, de fórma ovoide ou esferica, rezultantes da divizão dos flajelados semeados (Est. 12, Fig. 98—103 e Est. 13, Fig. 23).

Ha agóra predominancia, a principio, de pequenos organismos piriformes aflajelados (Est. 12 e Fig. 99-102) que mostram, quando córados pelo metodo de ROSENBUSCH, estrutura identica á das fórmas similares dos conorrinos (Est. 13, Fig. 23). Nos preparados pelo GIEMSA, nestes organismos, o nucleo principal é visto como grande massa de cromatina, tendo, num dos pontos da periferia, o blefaroplasto.

Os organismos esfericos, de dimensões variaveis, não oferecem tambem outras minucias de estrutura, além das descritas no inséto. Nos preparados pelo GIEMSA, além dos granulos de volutina, vêm-se frequentemente, no plasma, muitos vacuolos.

Os organismos esfericos e piriformes se aprezentam em ajuntamentos, constituidos, ás vezes, de numerozos individuos, vendo-se entre elles muitos com os nucleos em divizão,

Parasitäre Formen in den Speicheldrüsen des Conorhinus.

Bei drei Versuchen fand ich in Ausstrichpräparaten von den Speicheldrüsen der *Conorhinus*wanzen Entwicklungsphasen des *Schizotrypanum cruzi,* die zweifellos die Form darstellen, welche auf Wirbeltiere übertragen wird. Der eine Befund wurde bei einem ausgewachsenen Conorhinus gemacht, welcher 12 Tage vorher ein Exemplar von *Callithrix* gestochen hatte. Dabei fand ich bei frischer Untersuchung des Materials der Hauptspeicheldrüsen Flagellaten, deren sehr lebhafte Bewegungen an die Parasiten aus der Leibeshöhle erinnerten. In trocken fixierten und nach GIEMSA gefärbten Ausstrichen beobachtete ich zweierlei Formen von sehr verschiedenem Aussehen: eine derselben erscheint als sehr langer und dünner Organismus, dessen Kernchromatin noch als langes Band angeordnet ist, welches ungefähr dem vierten Teile der Zelle entspricht; der Blepharoplast zeigt sich als grosses Chromatinkörperchen bald hinter dem Kerne und in dessen Nähe (Tafel 11, Fig. 74 und 75), bald am Hinterende der Zelle (Taf. 12, Fig. 76), bei einigen Formen fand ich weder Geissel noch undulierende Membran (Taf. 12, Fig. 76), was ich einer fehlerhaften Färbung zuschreibe, denn in anderen Beobachtungen zeigten fast alle Parasiten eine undulierende Membran und eine zum Teile adhärente, zum Teile freie Geissel (Taf. 11, Fig. 74 und 75).

Die zweite beobachtete Form bestand in einem breiten Organismus, dessen Blepharoplast viel kleiner war, als bei der vorigen Form, dabei genau am Hinterende gelagert; sie besitzt ferner einen nahezu eiförmigen Hauptkern, dessen Chromatin sich von demjenigen der Hauptform sehr unterscheidet. Dieser Organismus war in meinen Beobachtungen viel seltener; auch habe ich in der Leibeshöhle keine entsprechenden Formen gefunden.

Die anderen beiden Beobachtungen von Flagellaten aus Speicheldrüsen wurden bei Wanzen gemacht, welche in infizierten Wohnungen gefangen wurden. In diesem Falle

outros ligados entre si por filamentos de plasma, e, finalmente, organismos com nucleos e blefaroplastos multiplos.

Tornam-se depois flajelados estes organismos, atinjindo o estadio de critidias adultas. Nestas, como nas fórmas anteriores, a estrutura celular é de todo identica á das fazes correspondentes no invertebrado, pelo que nos dispensamos de referil-a. E tambem aqui estamos procedendo a pesquiza sobre os processos de divizão dos nucleos, dos quais daremos, mais tarde, conhecimento.

Nas culturas antigas é frequente observarem-se fórmas aberrantes de critidias, de grandes dimensões, com divizão multipla (Fig. 108 e 109 da Est. 12). As critidias adultas, simultaneamente com organismos piriformes e esfericos, permanecem longamente vivos nas culturas, até 2 mezes, sendo pozitivas, quazi sempre, as 2 primeiras sementeiras.

Nas culturas, portanto, o *Schizotrypanum cruzi* porta-se de modo identico áquelle estudado no tubo dijestivo do hemiptero, havendo perfeita semelhança em quazi todas as fazes das evoluções na cultura e no hospedeiro intermediario. Não encontrámos, porém, nas culturas artificiais, os organismos esfericos, cercados de pelicula condensada, nem as fórmas de esquizogonia assinaladas no tubo dijestivo do inséto. Em compensação, duas culturas de sangue de sagui mostraram, no fim de 10 dias, fórmas parazitarias que não haviamos observado ainda. Nestes, vimos flajelados com blefaroplasto colocado atraz do nucleo principal, achando-se este ultimo com a cromatina disposta em longa faixa lonjitudinal. E' um aspeto muito semelhante ao observado em parazitos adultos das glandulas salivares e tambem do sangue periferico.

Outra fórma tambem encontrada só duas vezes nas culturas, aprezentava-se ovoide, tendo nucleo unico com a cromatina disposta em dois lóbos. O aspeto desta fórma, nos preparados, fixados secos e córados pelo GIEMSA, lembrava muito o ooquineto do hemoproteo. Indecizas, porém, como se aprezentam, estas fazes ultimas exijem maiores e

zeigte die Mehrzahl der Hemipteren zwar Flagellaten im Hinterdarm, aber keine in den Speicheldrüsen; ein unbestimmter, aber sehr kleiner (nur nach Hundertsteln zählender) Teil war gleichzeitig infiziert und infizierend, indem er in den Speicheldrüsen die beschriebenen Parasiten enthielt. Diese Beobachtung wird übrigens bestätigt durch die Versuche, mittelst des Stiches von in menschlichen Wohnungen gesammelten Conorhinen zu infizieren, wobei nur ein kleiner Teil dieser Wanzen sich infektiös erweist.

Künstliche Kultur des Parasiten.

Das *Schizotrypanum cruzi* lässt sich leicht nach NOVY und MAC NEAL auf Blutagar züchten. Bei meinen Kulturen verfahre ich folgendermassen: Ich entnehme das Blut aus dem Herzen von Kaninchen, ein Prozess, der dem Durchschneiden der Karotiden vorzuziehen ist, da man, ohne das Tier zu opfern, in jeder Sitzung bis 40 ccm. Blut entnehmen kann. Ich mische gleiche Teile des defibrinierten Blutes mit gleichen Teilen geschmolzenen, bei 50° aufbewarten Agars und übertrage auf das gewöhnlich reichliche Kondenswasser.

Systematische Untersuchungen zeigen die ersten Modifikationen der Flagellaten von der 6. Stunde an, wobei hier, wie im Darmkanale des Zwischenwirtes, die Anfangserscheinungen folgende sind: Wanderung des Blepharoplasten in die Nähe des Hauptkernes, Verlust der Geissel und undulierenden Membran, endlich die Abrundung des Parasiten (Taf. 13, Fig. 23 a — 23 b). Hierauf folgt eine rasche Vermehrung, sodass nach 20 Stunden in der Kultur neue Organismen erscheinen, welche aus der Teilung der eingesäten Flagellaten enstehen und eine runde und eiförmige Gestalt besitzen (Taf. 12, Fig. 98 — 103 und Taf. 13, Fig. 23).

Anfangs herrschen kleine, birnförmige, geissellose Organismen (Taf. 12, Fig. 99—102) vor, welche bei der Färbung nach ROSENBUSCH dieselbe Struktur zeigen, wie die entsprechenden Formen aus dem *Conorhinus.* In GIEMSA-Präparaten sieht man in diesen

mais metodicas pesquizas, pelo que deixamos de aprezentar agóra os dezenhos e os dados sobre a estrutura dellas.

Transmissão da infeção pela picada do Conorhinus e por injeção dos flajelados do tubo dijestivo e das culturas. Virulencia variavel do parazito. Evolução da infeção nos animais de laboratorio.

Conforme referimos, o primeiro cazo de infeção pelo *Schizotrypanum cruzi* foi obtido num *Callithrix* picado por alguns conorrinos trazidos da zona contaminada. Os insétos estavam, havia mais de 8 dias, sem refeição em qualquer vertebrado, o que indica, já neste primeiro cazo, a auzencia de transmissão mecanica do parazito. Maiores ensinamentos, porém, oferecem as experiencias seguintes, realizadas com larvas, nacidas no laboratorio, como passamos a referir:

Quatro larvas, no 5.º dia apoz a eclosão, picaram um *Callithrix* infetado desde 1 mez, com flajelados não muito abundantes no sangue periferico.

Duas destas larvas, 10 dias depois, picaram uma cobaia que morreu no 6.º dia aprezentando no pulmão grande numero de fórmas de esquizogonia e no sangue periferico alguns parazitos intraglobulares. As 2 larvas restantes infetaram mais 2 cobaias, uma das larvas no 20.º e a outra no 25.º de infeção. Uma dessas cobaias morreu no 7.º dia apoz a picada, com grande numero de fórmas de esquizogonia no pulmão, sem flajelados, apreciaveis em exame rapido, no sangue periferico; a outra cobaia morreu no 12.º dia, aprezentando algumas fórmas de esquizogonia no pulmão e raros flajelados no sangue periferico.

Nova experiencia, com 6 larvas, 3 dellas alimentadas em *Callithrix* com infeção antiga e 3 alimentadas em cobaia com numerozos parazitos no sangue periferico, deu o seguinte rezultado: as 3 larvas, infetadas no *Callithrix*, picaram no 8.º dia uma cobaia, que mostrou parazitos no sangue periferico 15 dias depois; as larvas alimentadas na co-

Formen den Hauptkern als grosse Chromatinmasse, welche an einem beliebigen Punkte der Peripherie den Blepharoplasten aufweist.

Auch die runden Formen von wechselnden Dimensionen zeigen nur die bei Insekten beschriebenen Strukturverhältnisse. In GIEMSA-Präparaten sieht man im Plasma ausser den Volutinkörperchen nicht selten zahlreiche Vakuolen.

Runde und birnförmige Formen zeigen sich in Anhäufungen, die oft von sehr zahlreichen Individuen gebildet sind, unter welchen viele Kernteilungen aufweisen, andere mehrfache Blepharoplasten und Kerne enthalten und wieder andere durch Plasmafäden gegenseitig verbunden sind.

Diese Organismen bilden dann eine Geissel und gehen in die erwachsene Crithidienform über, bei welcher, wie bei den vorigen, die Zellstruktur den entsprechenden Formen aus der Wanze entspricht, weshalb ich sie auch nicht beschreibe. Ich untersuche auch bei diesen den Kernteilungsprozess und werde darüber später berichten. In älteren Kulturen beobachtet man häufig abweichende Crithidienformen von grossen Dimensionen und in mehrfacher Teilung begriffen (Taf. 12, Fig. 108 u. 109). Kugel- und Birnformen bleiben neben den erwachsenen Crithidien in den Kulturen lange Zeit — bis zu 2 Monaten — am Leben und die beiden ersten Ueberimpfungen gehen fast immer gut an.

Das *Schizotrypanum cruzi* verhält sich demgemäss in den Kulturen ganz wie im Darme der Wanze, sodass fast alle Entwicklungsphasen vollständig übereinstimmen. Doch fand ich in den künstlichen Kulturen weder die runden, von einer verdichteten Membran umgebenen Organismen, noch die im Darmkanal nachgewiesenen Schizogonieformen. Dagegen zeigten 2 Kulturen aus dem Blute des Pinseläffchens nach 10 Tagen parasitäre Formen, welche ich noch nicht beobachtet hatte. Hier sah ich Flagellaten mit hinter dem Hauptkerne liegenden Blepharoplasten, wobei der letztere das Chromatin zu einem langem Streifen angeordnet zeigte. Dieses Bild gleicht demjenigen des erwachsenen Parasiten aus dem peripheren Blute und den Speicheldrüsen.

baia picaram sem rezultado novas cobaias no 8.o, no 14.o e no 20.o dias.

Grande numero de outras experiencias, com larvas nutridas em cobaias intensamente infetadas, foram negativas, não obstante aprezentarem todas as larvas, com absoluta constancia, as fórmas de critidias que referimos no intestino médio. Tambem o exame do liquido da cavidade geral e as pesquizas das glandulas salivares destas larvas deram rezultados negativos. Nas larvas cujas picadas foram contaminantes para cobaias não fizemos, devido ao intuito de apreciar o prazo maximo da condição infetante, pesquizas complementares nas glandulas salivares, perdendo as larvas sem ter tido esclarecimento importante que tais pesquizas poderiam trazer.

Temos diversas experiencias de infeção de cobaias por picada de conorrinos adultos; nestas, porém, devido á possibilidade de serem infetantes os insétos colhidos na zona contaminada, não se póde apreciar o tempo de evolução completa do parazito. Da relação centezimal de conorrinos infetantes, quando colhidos em habitações humanas, não temos por emquanto idéa exata; é certo, porém, que naquella relação influe especialmente a procedencia dos insétos. Tivemos coleções de conorrinos, da mesma procedencia, nas quais existiam muitos insétos infetantes; quando com outras coleções, de procedencia diversa, as tentativas de infeção foram todas negativas.

Podemos, das experiencias até agora realizadas, tirar as concluzões seguintes sobre a transmissão do *Schizotrypanum cruzi* pela picada do *Conorhinus:*

1.o Certa proporção, indeterminada, de conorrinos colhidos nas habitações de zona contaminada, é infetante para os vertebrados.

2.o As larvas creadas no laboratorio e alimentadas em animais contaminados, mesmo com numerozos parazitos no sangue periferico, nem sempre se tornam infetantes, apezar de aprezentarem flajelados no intestino médio.

3.o As larvas que, em tal cazo, se tornam contaminantes, só o são, desde o 8.o ou 10.o

Eine zweite Form wurde gleichfalls zwei mal in den Kulturen beobachtet; sie ist oval und zeigt einen einzelnen Kern, dessen Chromatin in 2 Lappen angeordnet ist. Die Form derselben erinnert in trocken fixierten und nach GIEMSA gefärbten Präparaten sehr an den Ookineten des *Hämoproteus.* Da sich jedoch diese letzten Formen nicht sehr deutlich erscheinen, sind noch mehr eingehende und methodische Untersuchungen nötig, weshalb ich jetzt keine Zeichnungen und nähere Angaben über ihre Struktur gebe.

Uebertragung der Infektion durch den Stich des Conorhinus, die Flagellaten aus dem Darmkanal und die Kulturformen.

Wie schon berichtet, wurde die erste Infektion durch *Schizotrypanum cruzi* bei einem Pinseläffchen beobachtet, an welchem aus infizierter Zone stammendende Conorhinen gesogen hatten. Dieselben hatten seit mehr als 8 Tagen kein Blut aufgenommen, was bereits in diesem ersten Falle die mechanische Uebertragung des Parasiten ausschloss. Genauere Aufschlüsse erhielt ich aus den folgenden Versuchen mit Larven, die im Laboratorium ausgeschlüpft waren:

Fünf Tage nach dem Ausschlüpfen sogen 4 Larven an einer seit einem Monate infizierten *Callithrix* mit sehr zahlreichen Flagellaten im peripheren Blute. 10 Tage darauf stachen 2 dieser Larven ein Meerschweinchen; dasselbe starb am 6. Tage und zeigte in den Lungen zahlreiche Schizogonieformen und im peripherischen Blute einige intraglobuläre Parasiten. Die 2 übrigen Larven infizierten 2 Meerschweinchen, eine derselben am 20., die andere am 25. Tage nach der Infektion. Das eine Meerschweinchen starb 7 Tage nach den Stichen mit zahlreichen Schizogonieformen in den Lungen, während im peripherischen Blute eine nicht sehr eingehende Untersuchung keine Flagellaten nachwies; das andere Versuchstier starb am 12. Tage und zeigte in den Lungen einige Schizogonieformen nebst spärlichen Flagellaten im peripheren Blute.

Ein neuer Versuch wurde mit 6 Larven angestellt; davon hatten 3 an einer seit lan-

dia apoz a refeição de sangue infetado, conservando essa condição por espaço de tempo longo e ainda indeterminado.

4.º As picadas de larvas, 2 ou 3 dias depois de uma refeição em animal infetado, não contaminam os vertebrados.

Claro está que estas concluzões, embora bazeadas em experiencias izentas de qualquer cauza de erro, não trazem ao assunto esclarecimento completo, sendo necessario aguardar o rezultado das novas pesquizas a que procedemos atualmente.

Obtivémos, inoculando material do intestino médio de conorrinos adultos, colhidos em habitações humanas e sem prévia refeição contaminada no laboratorio, a infeção de diversas cobaias, as quais chegaram a aprezentar, no sangue periferico, numerozos flajelados.

Com o material do intestino médio de larvas, infetadas no laboratorio, conseguimos tambem a infeção de diversas cobaias. Fizemos inoculações, neste cazo, depois de 6 dias da refeição contaminante, não tendo ainda experimentado antes daquelle prazo, o que devemos fazer ainda. Nas inoculações do material do intestino de larvas e de conorrinos adultos, tivemos alguns rezultados negativos, sem que possamos por emquanto explicar a causa delles. Aliaz, ainda neste ponto, para maior segurança das concluzões, devemos voltar á novas pesquizas.

A inoculação de cultura não oferece concluzão diversa da inoculação do material do intestino médio; muitas vezes infetámos cobaias com inoculações de culturas, falhando porém, algumas das experiencias realizadas.

Variabilidade na virulencia do Schizotrypanum cruzi.

A virulencia do *Schizotrypanum cruzi* é influenciada por diversos fatores, cuja natureza e cujos efeitos não conhecemos ainda, de modo exato.

Passajens sucessivas do parazito, atravez de animais sensiveis atenuam, sem duvida, a virulencia delle; por outro lado, o parazito,

gem infizierten *Callithrix*, die anderen 3 an einem Meerschweinchen mit zahlreichen Parasiten im peripheren Blute gesogen. Das Resultat des Versuches war folgendes: die 3 am Affen infizierten Larven stachen am 8. Tage ein Meerschweinchen, welches 15 Tage später Parasiten im peripheren Blute zeigte; die Larven vom Meerschweinchen stachen am 8., 14. und 20. Tage andere Meerschweinchen mit negativem Resultate.

Noch viele andere Versuche mit Larven, die an stark infizierten Meerschweinchen gesogen hatten, blieben resultatlos, obwohl die Larven mit absoluter Sicherheit die erwähnten Crithidienformen im Mitteldarme aufwiesen. Ebenso blieben die Untersuchungen der Flüssigkeit aus der Leibeshöhle und die der Speicheldrüsen ohne Resultat. Dagegen machte ich keine Kontrollversuche an den Speicheldrüsen der Larven, deren Stich Meerschweinchen infiziert hatte, da ich dieselben zur Feststellung der längsten Dauer der Infektion gebrauchte; so verlor ich die Larven, ohne die wichtige Aufklärung zu erhalten, welche diese Versuche hätten geben können.

Ich machte auch verschiedene Infektionsversuche am Meerschweinchen, die ich von erwachsenen Conorhinen stechen lies; doch liess sich bei solchen die Entwicklungsdauer des Parasiten nicht feststellen, weil diese in infizierter Zone gesammelten Insekten schon infektiös sein konnten. Ueber den Prozentsatz der Infektiosität der in menschlichen Wohnungen gefangenen Conorhinen habe ich keinen richtigen Begriff, doch steht soviel fest, dass derselbe besonders von der Herkunft der Tiere abhängt. So fanden wir in einer Sendung von Conorhinen von einem Orte zahlreiche infektiöse Exemplare, während bei Sendungen von anderer Herkunft alle Infektionsversuche resultatlos blieben.

Aus den bisher angestellten Untersuchungen über die Uebertragung des *Schizotrypanum cruzi* durch den Stich des *Conorhinus* kann ich folgende Schlüsse ziehen:

1. Ein unbestimmter Prozentsatz von aus Wohnungen der infizierten Zone stammenden Conorhinen ist für Wirbeltiere infektiös.

atenuado, readquire a virulencia inicial, quando inoculado em outra especie animal. As infeções produzidas nas cobaias por picadas de conorrinos são, de regra, mais graves que as produzidas por inoculações de sangue contaminado. As primeiras matam o animal em espaço de tempo variavel, comumente de 5 a 10 dias, ao passo que as ultimas permitem a sobre-vida até de 2 mezes. E' frequente, nas infeções pelo *Conorhinus,* as cobaias morrerem ainda com auzencia de flajelados no sangue periferico, aprezentando no pulmão grande numero de fórmas esquizogonicas.

As reinóculações de sangue de cobaias, inicialmente infetadas pelo inséto, modificam consideravelmente, tanto a ação patojenica, quanto a atividade de multiplicação do parazito, de modo que, apoz certo numero de reinoculações, as infeções obtidas tornam-se menos intensas e a morte das cobaias mais demorada. Si, porém, inoculamos o parazito assim tratado num *Callithrix,* parece que elle readquire, em parte, a virulencia perdida.

Influe, ainda na intensidade da parazitoze, a via de introdução do flajelado, parecendo, de nossas experiencias, serem as inoculações intra-peritoneais as que produzem infeções maiores e mais rapidamente mortais.

Sobre este ponto merecem referencia especial nossas observações sobre o tripanozómida de proveniencia humana: Inoculámos, como dissémos, 2 cobaias e um *Callithrix,* com sangue da primeira doente, morrendo aquellas duas em poucos dias e sobrevivendo o *Callithrix* 2 mezes, vindo a morrer em estado de grande emagrecimento e de consideravel hipoglobulia. Inoculámos, com o sangue do *Callithrix,* 6 cobaias que mostraram, apoz 15 dias, parazitos no sangue periferico, morrendo todas dentro de 1 mez. Com sangue destas cobaias inoculámos novas, que só muito tarde, 20 ou 30 dias depois, aprezentaram parazitos na periferia. Estas cobaias viveram mais de dois mezes, morrendo em varios periodos, quazi todas mostrando, na ocazião da morte, fórmas esquizogonicas no pulmão. Houve, portanto, nesta série de experiencias uma primeira atenuação de virulencia pela passajem no *Callithrix,* visto como

2. Im Laboratorium aufgezogene, an infizierten Tieren mit zahlreichen Parasiten im peripheren Blute gefütterte, Conorhinuslarven zeigen sich nicht immer infektiös, obwohl sie Flagellaten im Mitteldarme beherbergen.
3. Die Larven, welche unter solchen Verhältnissen sich infektiös erweisen, tun es erst am 8. bis 10. Tage nach der Aufnahme des infizierten Blutes, behalten aber diese Eigenschaft während eines langen Zeitraumes, dessen Grenzen noch nicht bestimmt sind.
4. 2 bis 3 Tage nach Aufnahme des infizierten Blutes sind die Stiche der Larven nicht infektiös für Wirbeltiere.

Obwohl die Schlüsse auf von Fehlerquellen reinen Versuchen beruhen, können sie doch natürlicherweise die Frage nicht vollständig aufklären; deswegen muss das Resultat neuer Versuche, mit denen wir zur Zeit beschäftigt sind, abgewartet werden.

Durch Einspritzung des Mitteldarminhaltes erwachsener, aus menschlichen Wohnungen stammender Conorhinen, die im Laboratorium kein infiziertes Blut aufgenommen hatten, erhielt ich eine Infektion bei verschiedenen Meerschweinchen, welche später im Blute zahlreiche Flagellaten aufwiesen. Auch mit Material aus dem Mitteldarm von — im Laboratorium infizierten — Larven, bewirkte ich eine Infektion bei verschiedenen Meerschweinchen. Dabei stammte das Infektionsmaterial aus der Zeit nach dem 6. Tage der Infektion; Versuche vor dieser Zeit wurden nicht angestellt, sollen aber noch gemacht werden. Bei der Uebertragung von Material aus dem Darme von Larven und erwachsenen Exemplaren dieser Wanzen erhielten wir einige negative Resultate, ohne zur Zeit die Ursache derselben erklären zu können. Uebrigens werden wir auch hierüber zu grösserer Sicherheit in unseren Schlüssen weitere Untersuchungen anstellen.

Die Uebertragung von Kulturen gestattet keine anderen Schlüsse, als die Einspritzung von Material aus dem Mitteldarme; manchmal infizierte ich Meerschweinchen mit Einsprit-

o parazito humano, que a principio matou cobaias em 5 dias, só o fez depois em 1 mez ou pouco menos. Segunda e mais intensa atenuação sofreu o virus no organismo das cobaias, conforme o rezultado das reinoculações, que só mataram os animais depois do 2.º mez.

A grande virulencia do parazito humano para as cobaias revelou-se outra vez na inoculação de sangue do doente JOSE, em dois destes animais, que morreram dentro de poucos dias e na terceira experiencia, na qual obtivémos a infeção de uma cobaia (que permaneceu viva mais de um mez) a quantidade de sangue inoculado foi de menos de $^1/_2$ cc., quando nos 2 primeiros cazos injetámos no peritoneo das cobaias, de 1 a 2 ccm.

Convém assinalar aqui a intensidade diversa da infeção dos doentes, o que impossibilita tirar destes rezultados, a respeito da virulencia do parazito, concluzões definitivas. De fato no primeiro doente havia flajelados no sangue periferico, apreciaveis mesmo em exame rapido, ao passo que nos outros só a inoculação de animais sensiveis póde revelar a existencia da infeção.

Evolução da molestia na cobaia e no Callithrix.

A evolução da esquizotripanozomiase nos animais de experiencia depende, sobretudo, da proveniencia do parazito. Póde ser estabelecida como regra, a morte rapida dos animais, ás vezes com flajelados raros ou sem elles no sangue periferico, quando infetados pelo *Conorhinus*. Nas inoculações sucessivas, porém, na mesma especie animal, a sobrevida póde ser longa, atinjindo 2 mezes e mais na cobaia e no *Callithrix*. Ha, nestes cazos, periodos de maior abundancia de parazitos no sangue periferico. Em alguns animais observámos dezaparecimento rapido dos flajelados da periferia, lembrando as crizes verificadas em algumas espiroquetozes. Outra observação, muitas vezes repetidas, é a da morte dos animais em periodo de ativa esquizogonia do parazito. As cobaias aprezentam, nestas condições, os capilares do pul-

zung von Kulturen, während wieder andere Versuche resultatlos blieben.

Schwankungen in der Virulenz von Schizotrypanum cruzi.

Die Virulenz von *Schizotrypanum cruzi* steht unter dem Einflusse verschiedener Faktoren, deren Natur und Wirkungen noch nicht genau bekannt sind. Wiederholte Passagen durch empfindliche Tiere schwächen die Virulenz in deutlicher Weise ab; andererseits nimmt der Parasit nach der Abschwächung die ursprüngliche Virulenz wieder an, wenn er auf eine andere Tierart übertragen wird. Die Infektionen, welche bei Meerschweinchen durch die Stiche von Conorhinen erzeugt werden, sind in der Regel schwerer, als diejenigen, die durch Einführung infektiösen Blutes entstehen. Erstere töten die Tiere nach einem wechselnden Zeitraum von gewöhnlich 5 bis 10 Tagen, während letztere ein Ueberleben bis zu 2 Monaten gestatten. Bei Infektion durch Conorhinen sterben die Meerschweinchen nicht selten schon, wenn noch keine Flagellaten im peripheren Blute vorkommen, während in den Lungen zahlreiche Schizogonieformen zu finden sind.

Die Ueberimpfung des Blutes von ursprünglich durch den Stich von Conorhinen infizierten Meerschweinchen bewirkt eine beträchtliche Aenderung in Beziehung auf die Vermehrungsenergie der Parasiten, so dass nach einer gewissen Zahl von Passagen die erzeugten Infektionen weniger intensiv werden und der Tod der Meerschweinchen sich verzögert. Uebertragen wir jedoch den so behandelten Parasiten auf eine *Callithrix*, so scheint er die verlorene Virulenz teilweise wieder zu gewinnen.

Auch der Ort der Einimpfung beeinflusst die Intensität des parasitären Prozesses; nach meinen Experimenten scheinen intraperitoniale Einspritzungen die stärksten und am schnellsten tödtlichen Infektionen hervorzurufen.

Hier verdienen die Versuche mit Trypanosomen menschlicher Herkunft besonders Erwähnung; wie berichtet, infizierte ich mit

mão repletos de fórmas esquizogonicas, coincidindo o fato com diminuição e ás vezes dezaparecimento dos flajelados do sangue periferico.

Entre os sintomas que se observam nos animais de experiencia, além de elevação termica, grande emagrecimento e hipoglobulia, devemos referir o enfartamento ganglionar generalizado, em alguns cazos muito consideravel, e afeções oculares. Esta é muito frequente no *Callithrix* e não raro determina a perda completa da vizão. Finalmente, registrámos a observação frequente da morte dos animais em convulsão.

Considerações gerais.

I. Sistematica.

A existencia de relações filojeneticas, muito estreitas, entre os tripanozomos e os parazitos hematicos intra-globulares, foi primeiro revelada, em 1904, pelas memoraveis pesquizas de SCHAUDINN sobre o ciclo evolutivo do *Haemoproteus noctuae* e do *Leucocytozoon ziemanni*. Nellas o grande pesquizador demonstrou, no organismo do vertebrado, para o *Haemoproteus*, a alternancia de fazes de repouzo intraglobulares, aflajeladas, com a de flajelados livres no plasma. No *Culex pipiens*, de uma fecundação oogamica entre elementos sexuados tipicamente halteridicos, rezultaria um ooquineto, cuja evolução conduziria a parazitos flajelados. No *Leucozytozoon ziemanni* o ooquineto daria logar, por divizão multipla, á formação de organismos espiroquetiformes, com morfolojia de todo ponto identica á dos tripanozomos tipicos.

Inumeras vezes contestadas, sem que, entretanto, a auzencia de verdade nella tenha sido até agóra demonstrada, de modo seguro, as observações de SCHAUDINN patentearam o estreito parentesco entre os tripanozomos e o grupo de protozoarios hematicos, até então autonomo e que parecia bem delimitado, dos denominados hemosporidios.

O fundo de verdade daquellas observações veiu, bem depressa, revelar-se em outras pesquizas, nas quais protozoarios intracelu-

dem Blute der ersten Patienten zwei Meerschweinchen und eine *Callithrix*, wobei erstere nach wenigen Tagen starben, während der Affe noch zwei Monate lebte und im Zustande grosser Abmagerung und bedeutender Hypogiobulie zu Grunde ging. Mit dem Blute der *Callithrix* impfte ich sechs Meerschweinchen, welche nach 15 Tagen im peripheren Blute Parasiten aufwiesen und innerhalb eines Monates starben. Mit dem Blute dieser Meerschweinchen impfte ich andere, welche die Parasiten erst viel später — 20 bis 30 Tage nachher — im peripheren Blute zeigten. Sie lebten mehr als zwei Monate und starben nach verschiedener Zeit, wobei fast alle Schizogonieformen in den Lungen aufwiesen. Bei dieser Versuchsreihe beobachtete man also eine primäre Virulenzverminderung nach der Passage durch die *Callithrix*, indem der vom Menschen stammende Parasit, der ursprünglich Meerschweinchen in 5 Tage tötete, dies nun erst nach einem Monate oder nur wenig früher tat. Eine zweite, noch intensivere Abschwächung erlitt das Virus im Organismus der Meerschweinchen, wie der Erfolg der Weiterimpfungen zeigt, welche den Tod der Tiere erst nach mehr wie 2 Monaten zur Folge hatten.

Die grosse Virulenz des menschlichen Parasiten für Meerschweinchen zeigte sich wieder bei der Uebertragung des Blutes von dem Patienten JOSE auf zwei dieser Tiere, welche nach wenigen Tagen starben. Bei einem dritten Versuche, in welchem ein Meerschweinchen infiziert wurde und mehr wie einen Monat am Leben blieb, war die Menge des übertragenen Blutes weniger als $^1/_2$ cc, während ich von den beiden ersten Kranken je 1 bis 2 cc. in die Bauchhöhle der Meerschweinchen einspritzte.

Es muss hier die verschiedene Intensität der Infektion bei den einzelnen Patienten betont werden, welche es unmöglich macht, aus diesen Resultaten endgültige Schlüsse auf die Virulenz der Parasiten zu ziehen. So waren bei den ersten Patienten schon bei flüchtiger Untersuchung Parasiten im peripheren Blute nachzuweisen, während bei den anderen die Infektion nur durch Einimpfung empfindlicher Tiere nachgewiesen werden konnte.

lares aflajelados mostraram, nas culturas artificiais, fórmas flajeladas com aspeto morfolojico das critidias. Assim MYAJIMA obteve, nas culturas de piroplasma, fórmas de flajelados que o pesquizador supõe serem fazes evolutivas daquelle parazito. O mesmo rezulta das pesquizas de ROGERS e CH. NICOLLE, com a *Leishmania,* que daria, nas culturas, fórmas flajeladas bem carateristicas.

Por outro lado, os metodos modernos de citolojia dos protozoarios vieram ainda, *maxime* nos trabalhos de HARTMANN e PROWAZEK, revelar um outro carater comum aos dois grupos de parazitos, hemosporidios e tripanozómidas. Referimo-nos a dualidade nuclear, bem nitida nos generos *Trypanosoma*, *Crithidia* e *Herpetomonas,* sendo aí o segundo nucleo, o locomotor, reprezentado pelo blefaroplasto.

Nos hemosporidios, algumas vezes, aspeto morfolojico analogo ao dos tripanozomos é encontrado numa faze qualquer do ciclo evolutivo, confórme verificaram SCHAUDINN, nos merozoitos e esporozoitos da malaria, e HARTMANN, naquelles e no microgámeta do proteozoma.

Quando assim não é, na auzencia de qualquer aparelho flajelar, não raro é possivel verificar a dualidade de nucleos, mesmo em fórmas de repouzo intraglobulares. E' o que acontece nas hemogregarineas (V. PROWAZEK) no esporozoito da malaria (ED. e ET. SERGENT), na *Lankesterella ranarum* (FRANÇA, BILLET e BRUMPT) no *Halteridium* (HARTMANN e WOODCOCK), no *Piroplasma bigeminum* etc. Ainda assim a autonomia e a delimitação dos hemosporidios, delles com os flajelados incluidos na antiga familia de tripanozomidas, parecia ter baze solida em condições biolojicas carateristicas, como fossem a multiplicação por meio de fórmas esquizogonicas regulares e a constancia do parazitismo intra-celular. Estas duas condições, aliaz, acham-se ligadas por uma relação de dependencia, sendo a multiplicação esquizogonica, provavelmente, consequencia do parazitismo intra-celular (HARTMANN). Nem faltam aqui, no processo de multiplicação, fórmas de aproximação entre os tripanozó-

Verlauf der Krankheit bei Meerschweinchen und Callithrix.

Der Verlauf der Infektion mit *Schizotrypanum cruzi* bei Versuchstieren hängt besonders von der Herkunft des Parasiten ab. Als Regel gilt der rasche Tod der Tiere — nicht selten mit wenigen oder ganz fehlenden Parasiten im peripherischen Blute — bei der Infektion durch Conorhinen. Bei derselben Tierart kann jedoch bei späteren Uebertragungen das Leben länger erhalten bleiben und zwar bis zu 2 Monaten und länger bei Meerschweinchen und *Callithrix.* In solchen Fällen gibt es Perioden, in welchen die Parasiten im peripheren Blute zahlreicher erscheinen. Bei einigen Tieren beobachtete ich rasches Verschwinden der Parasiten von der Peripherie, was an die Krisen erinnert, welche bei Spirochätosen beobachtet werden. Eine andere, häufig wiederholte, Beobachtung betrifft den Tod der Tiere in einer Periode aktiver Schizogonie des Parasiten. Die Meerschweinchen zeigen in diesem Falle die Lungenkapillaren voll von Schizogonieformen, während gleichzeitig die Flagellaten im peripheren Blute abnehmen oder ganz fehlen.

Von Krankheitssymptomen, welche bei Versuchstieren beobachtet werden, müssen — neben Temperatursteigerungen, starker Abmagerung und Hypoglobulie — allgemeine, manchmal sehr beträchtliche Lymphdrüsenanschwellungen und Augenaffektionen, besonders Keratitis hervorgehoben werden. Letztere ist bei der *Callithrix* besonders häufig und bedingt nicht selten vollständigen Verlust des Sehvermögens. Endlich erwähne ich den häufig beobachteten Tod des Tieres unter Konvulsionen.

Allgemeine Betrachtungen.

1. KLASSIFIKATION.

Das Bestehen engerer phylogenetischer Beziehungen zwischen den Trypanosomen und den intraglobulären Blutparasiten wurde zuerst 1904 durch die denkwürdigen Forschungen aufgedeckt, welche SCHAUDINN über den Entwicklungszyklus des *Haemoproteus noctuae* und *Leukocytozoon Ziemanni* machte. In diesen

midas e os hemosporidios. Assim temos como aperfeiçoamento á cizão binaria do *Trypanosoma brucei* e de outras especies, a cizão multipla do *Trypanosoma lewisi,* nos orgãos internos com aspeto de rozaceas, cujas unidades são em numero variavel; e tambem no *Trypanosoma rotatorium,* no sangue periferico, a divizão em 4 ou mais unidades, realizada em organismos arredondados (observação inedita no Instituto de Manguinhos).

Nos hemosporidios, a auzencia de aparelho flajelar, que muitas vezes tem reprezentação parcial no blefaroplasto, significa na opinião de HARTMANN, um fenomeno de redução, dependente da vida intracelular do parazito. Nesse ponto o *Haemoproteus,* pela alternancia de fazes intraglobulares com blefaroplasto e auzencia de flajelo e de fórmas flajeladas no plasma, reprezenta tranzição, bem carateristica, entre os tripanozomos e os hemosporidios.

Estes fatos e outros que não referimos, interpretados em demoradas considerações (*Archiv. für Protistenkunde,* 1908) levaram HARTMANN a modificar a classificação de protozoarios, introduzindo na sub-classe de flejelados a nova ordem de *Binucleata.* Nesta ficam incluidos em diversas familias, os parazitos hematicos que anteriormente formaram o grande grupo dos hemosporidios e os flajelados que, antigamente, formavam a familia dos tripanozomos.

O parazito que estudamos vem trazer a essa modificação da sistematica apoio inabalavel, visto reprezentar, entre os tripanozomos tipicos e os protozoarios incluidos no genero *Plasmodium,* fórma intermediaria bem caraterizada. Nelle, realmente existem condições biolojicas, alternantes nas diversas fazes do ciclo, pertencentes aos 2 grupos de parazitos. Ao em vez da cizão binaria, encontrada na maioria de tripanozomos ou da divizão multipla irregular do *Trypanosoma lewisi* temos aqui multiplicação por esquizogonia tipica e constante, sempre constituida do mesmo numero de individuos. Este processo mais aperfeiçoado de multiplicação se relaciona com a faze intracelular do parazito.

zeigte der hervorragende Forscher für *Haemoproteus,* dass im Organismus der Wirbeltiere ein Wechsel von intraglobulären, geissellosen Ruheformen mit frei im Plasma lebenden Flagellaten besteht. Aus einer oogamen Befruchtung von Geschlechtselementen mit typischen Halteridienformen entsteht im *Culex pipiens* ein Ookinet, dessen weitere Entwicklung zu geisseltragenden Parasiten führt. Bei *Leucocytozoon Ziemanni* erzeugte der Ookinet durch multiple Teilung Organismen von Spirochätenform mit einer derjenigen von typischen Trypanosomen vollständig gleichen Morphologie.

Sehr häufig bestritten, ohne dass ihre Unrichtigkeit bisher bestimmt erwiesen wäre, zeigten die Beobachtungen von SCHAUDINN die enge Verwandschaft zwischen den Trypanosomen und der Gruppe von Protozoen des Blutes, die bisher als, scheinbar gut umschriebene, selbständige Gruppe unter den Namen *Haemosporidien* vereinigt wurden.

Das tatsächlich Richtige in diesen Beobachtungen wurde bald durch andere Forschungen erwiesen, nach welchen intracelluläre, geissellose Protozoen in künstlichen Kulturen geisseltragende Entwicklungsstadien von *Leptomonas*-Form zeigten. So erhielt MIAJIMA in Kulturen von Piroplasmen Flagellatenformen, welche dieser Forscher für Entwicklungsstadien des Parasiten hielt. Ebenso ergibt sich aus den Untersuchungen von ROGERS, LEISHMAN und Ch. NICOLLE über *Leishmania* das Auftreten von gut charakterisierten geisseltragenden Formen.

Auf anderer Seite erwiesen die neuen cytologischen Methoden, besonders in den Arbeiten von HARTMANN und v. PROWAZEK, ein neues Charakteristikum, welches beiden Parasitengruppen, den *Haemosporidien* und *Trypanosomiden* gemein ist.

Es ist dies die Zweizahl der Kerne, welche deutlich bei den Gattungen *Trypanosoma, Crithidia, Leptomonas* und *Herpetomonas* hervortritt, bei welchen der zweite lokomotorische Kern durch den Blepharoplasten vertreten ist.

Bei den Haemosporidien finden sich manchmal denjenigen von Trypanosomen analoge Bildungen in irgend einer Phase des Entwicklungskreises, wie SCHAUDINN bei dem Mero-

Na evolução no sangue aprezenta o parazito uma primeira faze intraglobular, na qual os organismos iniciais, aflajelados, que, óra, mostram nucleo unico, achando-se nestes o blefaroplasto incorporado ao nucleo principal, óra são vistos já com dualismo nuclear. A' faze intraglobular, na qual tem logar, de regra, a formação do aparelho flajelar completo, segue-se outra de flajelados livres no plasma, na qual a morfolojia do parazito é inteiramente semelhante á dos tripanozomos. Em rezumo: processo de multiplicação por esquizogonia e parazitismo intracelular, de um lado, do outro, vida livre no plasma, com organização estrutural analoga á de qualquer especie do genero tripanozomo, constituem dois aspetos biolojicos, reunidos no mesmo parazito, que caraterizam grupos de protozoarios distanciados nas classificações anteriores — hemosporidios e tripanozomos, reunidos agóra na mesma ordem dos *Binucleata,* pela sistematica de HARTMANN.

Julgámos ainda que o processo de multiplicação por esquizogonia, com auzencia de divizão lonjitudinal binaria, aliado á faze intraglobular, deve determinar a creação de um novo genero, na familia *Trypanosomidae,* porquanto nenhum tripanozomo conhecido aprezenta, reunidos, aquellas condições biolojicas. Além de que, as grandes dimensões do blefaroplasto deste flajelado, constituem carateristica morfolojia que bem o distancia das especies conhecidas.

MESNIL e BRIMONT, para um parazito intraglobular do *Cholopus didactylus,* crearam o genero *Endotrypanum,* em virtude do aspeto morfolojico, proximo do dos tripanozomos e da vida intracelular. Não surpreenderam qualquer fórma livre do parazito e nem conhecem ontra faze de evolução. Não seria aceitavel, só pela condição de vida intraglobular comum, colocar nosso flajelado nesse genero, porquanto delle conhecemos carateristicas biolojicas que mais autorizam a creação de genero novo. E só na hipoteze de ser verificado, para o parazito de MESNIL, uma faze flajelada livre no plasma e a multiplicação esquizogonica, deverá o genero *En-*

und Sporozoiten der Malaria und HARTMANN bei denselben und den Microgameten von *Proteosoma* feststellte. Selbst beim Fehlen jedes Geisselapparates lassen sich, nicht selten sogar bei intraglobulären Ruhezuständen, doppelte Kerne erkennen. Dies geschieht bei den Haemogregarinen (V. PROWAZEK), bei den Sporozoiten der Malaria (ED. und ET. SERGENT), bei *Lankesterella ranarum* (FRANÇA, BILLET und BRUMPT), bei *Halteridium* (BERLINER und WOODCOCK), bei *Piroplasma bigeminum* (BREINL) u. s. w. Trotzdem schien die Autonomie der Haemosporidien und ihre Abgrenzung von den zur früheren Familie der Trypanosomen gehörigen Flagellaten in biologischen Ckarakteren festbegründet; es sind dies die Vermehrung durch regelmässige Schizogonie und der beständige intracelluläre Parasitismus. Diese Charaktere stehen übrigens nach HARTMANN in einem Abhängigkeitsverhältniss, indem die Vermehrung durch Schizogonie wahrscheinlich eine Folge des Zellparasitismus ist. Es finden sich aber auch bei dieser Vermehrungsweise Annäherungen zwischen Trypanosomiden und Haemosporidien. So haben wir als eine Weiterführung der Zweiteilung des *Trypanosoma brucei* und anderer Arten die multiple Teilung des *Trypanosoma lewisi* in den inneren Organen, in Form von Rosetten, deren Individuenzahl wechselt, ebenso bei *Trypanosoma rotatorium* im peripherischen Blute einen Zerfall in vier oder mehr Individuen nach Abrundung des Organismus (unveröffentlichte Beobachtung aus dem Institute von *Manguinhos*).

Bei den Haemosporidien bedeutet die Abwesenheit eines Geisselapparates, der häufig durch den Blepharoplasten teilweise repräsentiert wird, nach der Ansicht von HARTMANN ein Reduktionsphänomen als Folge der intracellulären Lebensweise der Parasiten. In dieser Hinsicht bildet *Haemoproteus* durch den Wechsel intraglobulärer Phasen (mit Blepharoplast, aber ohne Geissel) und geisseltragender Plasmaformen einen ausgesprochenen Uebergang von *Trypanosomen* zu *Haemosporidien.*

Diese und andere, hier nicht aufgeführte Tatsachen, welche er im Archiv für Protisten-

dotrypanum ser preferido ao que adotamos para nosso parazito.

O *Endotrypanum Schaudinni* binucleado intraglobular, é, com muita lojica, considerado pelos autores como fórma intermediaria entre os tripanozomos o os hemosporidios, constituindo tambem pela morfolojia e pelo parazitismo intracelular, um poderozo argumento em favor das idéas de SCHAUDINN sobre as estreitas relações filojeneticas entre os tripanozomos e o antigo grupo de hemosporidios.

II. DIMORFISMO SEXUAL.

A existencia nos tripanozomos, de diferenciações morfolojicas, ligadas á dualidade sexual, permanece ainda, apezar de numerozas pesquizas sobre o assunto, objeto de opiniões diverjentes. Foram os trabalhos de SCHAUDINN, que dispertaram a atenção dos pesquizadores para a existencia de diferenças sexuais, no inicio do ciclo evolutivo destes flajelados no organismo do inséto transmissor. No halteridio, porém, o diferente aspeto morfolojico dos gametos, sexualmente bem caraterizados, não oferece marjem á discussão.

Nos tripanozomos, quem primeiro rejistrou a dualidade de sexos foi V. PROWAZEK no *Trypanosoma lewisi*. Aqui, no estomago do *Haematopinus spinulosus*, a morfolojia do flajelado sofre modificações notaveis, que mais acentuam o diformismo do parazito, já existente no sangue do rato, e que corresponde á dualidade de sexos. V. PROWAZEK admite 2 sexos, considerando ainda duvidoza a existencia das fórmas indiferentes. MINCHIN, em longas pesquizas sobre o *Trypanosoma gambiense*, tambem conclue pela existencia de dois aspetos morfolojicos do tripanozomo no sangue do vertebrado, verificando ainda a permanencia desse dimorfismo, na faze inicial da evolução no tubo dijestivo da *Glossina palpalis*.

Diverjentes são as concluzões de BREINL e MOORE em diversas especies de tripanozomos: *gambiense, equiperdum, lewisi*. Para esses autores, si algum fenomeno de fecundação ocorre nos tripanozomos, consistiria elle em uma ação do blefaroplasto sobre o nucleo

kunde (1908) eingehend auseinandersetzte, bewogen HARTMANN, die Klassifikation der Protozoen abzuändern, indem er in die Unterklasse der Flagellaten die neue Ordnung der *Binucleaten* einreihte. Diese umfasst in verschiedenen Familien die Blutparasiten, welche früher die grosse Gruppe der *Haemosporidien* bildeten, nebst den Flagellaten, welche früher in die Familie der *Trypanosomen* gestellt wurden.

Der hier studierte Parasit bringt für diese Modifikation der Systematik eine feste Stütze, indem er eine deutliche Uebergangsform zwischen den typischen *Trypanosomen* und dem Genus *Plasmodium* bildet. In der Tat finden sich hier in den verschiedenen Entwicklungsphasen abwechselnd biologische Zustände, welche beiden Parasitengruppen angehören. An Stelle der Zweiteilung, wie sie bei der Mehrzahl der *Trypanosomen* vorkommt und der unregelmässigen multiplen Teilung des *Trypanosoma lewisi* haben wir hier eine Vermehrung durch typische und konstante Schizogonie, bei welcher stets eine bestimmte Zahl gleichartiger Individuen gebildet wird. Diese höchste Vervollkommnung des Vermehrungsprozesses steht in Beziehung zu einer intracellulären Phase der Parasiten. Bei seiner Entwicklung im Blute zeigt derselbe zuerst eine intraglobuläre Phase von geissellosen Organismen, welche bald einen einzigen den Blepharoplast einschliessenden Kern zeigen, bald einen doppelten Kern aufweisen. Auf eine intraglobuläre Phase mit — gewöhnlich vollständigem — Geisselapparat folgt eine andere im Plasma, welche morphologisch völlig den Trypanosomen gleicht. Es bilden also auf einer Seite Vermehrung durch Schizogonie und intracellulären Parasitismus, auf der anderen freies Leben im Plasma mit einer Struktur, welche einer beliebigen Art des Genus *Trypanosoma* entspricht, bei einem und demselben Parasiten zwei biologische Erscheinungsformen, welche sonst für zwei Protozoengruppen (*Haemosporidien* und *Trypanosomen*) charakteristisch sind; diese, in früheren Klassificationen getrennt, werden jetzt durch die Einteilung von HARTMANN in derselben Ordnung der *Binucleaten* vereinigt.

principal, realizada pela imigração de parte da substancia do primeiro para o interior do segundo. Este fenomeno reprezentaria fato capital do ciclo do parazito no organismo do vertebrado.

Breinl e Moore consideram a diversidade morfolojica dos tripanozomos no sangue como exprimindo estadios consecutivos de crecimento do flajelado, não encontrando, em qualquer das especies que estudaram, indicação alguma para a teoria do dimorfismo sexual.

Vejamos o que rezulta de nossas observações:

O dualismo morfolojico do *Schizotrypanum cruzi* aprezenta-se muito nitido em todas as fazes do ciclo, tanto no vertebrado como no inséto transmissor. São diferenças fundamentais de estrutura, especialmente acentuadas nos aspetos da cromatina do nucleo principal e do blefaroplasto, sendo inaceitavel querer fazel-as dependentes do crecimento, quando prezentes em dois organismos no mesmo estadio evolutivo. Assim é que nos merozoitos das fórmas esquizogonicas do pulmão, um dos organismos, que devemos considerar merozoito femeo mostra, desde logo, o blefaroplasto distinto do nucleo principal e neste o cariozoma muito menor que nos organismos considerados machos, nos quais, neste estadio, a substancia do blefaroplasto ainda se acha confundida com a do nucleo principal.

Nas fórmas intraglobulares e nos flajelados livres no plasma o mesmo diformismo se evidencia, espressando-se, como descrevemos, não só nas dimensões do plasma, carater secundario, mas ainda na estrutura do blefaroplasto, que num dos cazos é munido de pequeno cariozoma esferico e no outro possue cariozoma maior, ovoide quazi sempre, transversalmente colocado. Na estrutura do nucleo existe a mesma dualidade de aspeto, sendo de rejistrar a menor quantidade de substancia cromatica na fórma que consideramos femea. Os organismos jovens, cujos nucleos se aprezentam com a cromatina disposta em longa faixa lonjitudinal, bem caraterizam esse diformismo.

Ich bin, wie schon eingangs erwähnt, der Ansicht, dass die Vermehrung durch Schizogonie, bei Fehlen einer einfachen Längsteilung, in Verbindung mit der intraglobulären Entwicklungsphase die Aufstellung eines neuen Genus in der Familie *Trypanosomidae* nötig macht, da kein bekanntes *Trypanosoma* die Vereinigung dieser beiden Zustände aufweist. Ausserdem liegt in den grossen Dimensionen des Blepharoplastes dieses Flagellaten ein morphologisches Kennzeichen, welches ihn von den früher bekannten Arten trennt.

Mesnil und Brimont bildeten für einen intraglobulären Parasiten des *Coloepus didactylus* ein neues Genus *Endotrypanum*, auf Grund der morphologischen Aehnlichkeit mit den Trypanosomen und der intracellulären Lebensweise. Sie trafen keine freie Form des Parasiten und kennen auch keinen anderen Entwicklungszustand. Es geht vorläufig nicht an — nur wegen des gemeinsamen Kennzeichens des intraglobulären Vorkommens — unseren Flagellaten jenem Genus einzureihen, da von demselben biologische Charaktere bekannt sind, welche die Aufstellung einer neuen Gattung begründen. Nur im Falle, dass beim Mesnil'schen Parasiten eine freie geisseltragende Blutform und eine Vermehrung durch Schizogonie nachgewiesen würden, müsste das Genus *Endotrypanum* dem von mir gewählten *Schizotrypanum* vorgezogen werden.

Das *Endotrypanum schaudinni* wird als intraglobulärer *Binucleate* mit vollem Recht von den Autoren als eine Uebergangsform von *Trypanosoma* zu den *Haemosporidien* angesehen; durch seine Morphologie und seinen intracellulären Parasitismus bildet es ebenfalls einen wichtigen Beweis zu Gunsten der Ideen von Schaudinn über die engen phylogenetischen Beziehungen zwischen den *Trypanosomen* und der bisherigen Gruppe der *Haemosporidien*.

2. Sexueller Dimorphismus.

Trotz mannigfacher Untersuchungen über diese Frage bildet das Vorkommen verschiedener Trypanosomenformen als Ausdruck einer sexuellen Dualität noch immer den Gegenstand divergierender Ansichten. Durch die

No organismo do *Conorhinus* a dualidade morfolojica mais notavel é encontrada nas 2 fórmas das glandulas salivares, sendo uma dellas estreita, munida de grande blefaroplasto e aprezentando nucleo longo, disposto segundo o eixo lonjitudinal do parazito; a outra, de plasma mais largo, mostra menor blefaroplasto na extremidade posterior.

Não podemos, é claro, dos fatos observados nesse parazito, tirar concluzões gerais seguramente aplicaveis ás especies do genero tripanozomo; certo, porém, os fenomenos biolojicos aqui verificados não pódem estar muito distantes dos analogos, ainda mal estudados, nos tripanozômos tipicos.

III. O Schizotrypanum cruzi no organismo do hemiptero transmissor.

As pesquizas fundamentais sobre a intervenção das moscas hematofagas, na etiolojia das tripanozomiazes dos grandes mamiferos, foram realizadas por BRUCE, em memoraveis trabalhos sobre o nagana. Já antes, viajantes em certas rejiões da Africa e tambem os indijenas conheciam o efeito malefico das picadas da mosca tse-tse; coube, porém, a BRUCE demonstrar experimentalmente a transmissão do parazito do nagana, *Trypanosoma brucei* pela *Glossina morsitans*.

Foi assim iniciado novo capitulo na historia dos tripanozômos e aberta a via para numerozas pesquizas sobre esse assunto, do qual pontos importantes têm escapado, até agóra, ao dezejado esclarecimento.

A transmissão do plasmodio e do proteozoma pelos culícidas indicava serem provaveis fenomenos evolutivos analogos nos tripanozomos. Desde as pesquizas de BRUCE, porém, aquella opinião foi abandonada, sendo substituida pela hipoteze da transmissão do parazito ajindo os dipteros como simples veiculadores sem qualquer função biolojica especifica. A' tal concluzão levou o fato de ter BRUCE verificado que a *Glossina morsitans* só era transmissora dentro das primeiras 48 hóras apoz a picada contaminante; observações recentes, porém, talvez mais exatas, vieram modificar a noção adquirida.

Arbeiten von SCHAUDINN wurde zuerst die Aufmerksamkeit der Forscher auf das Vorkommen sexueller Unterschiede bei *Haemoproteus* zu Anfang seines Entwicklungszyclus im Darme des Uebertragers gerichtet. Beim *Halteridium* dagegen gestattet das verschiedene morphologische Bild der Gameten, welche deutlich zwei Geschlechtern entsprechen, keine weitere Diskussion.

Unter den *Trypanosomen* wurde die Zweigeschlechtlichkeit zuerst von PROWAZEK bei *Trypanosoma lewisi* angegeben. Bei diesem erleidet die Gestalt des Flagellaten im Magen des *Haematopinus spinulosus* deutliche Veränderungen, durch welche der Dimorphismus, der schon beim Blutparasiten der Ratte erkennbar ist und der Zweizahl der Geschlechter entspricht, noch deutlicher wird. V. PROWAZEK erkennt zwei Geschlechter an, während er das Vorkommen indifferenter Formen als noch zweifelhaft ansieht. Bei seinen eingehenden Untersuchungen über *Trypanosoma gambiense* gibt MINCHIN ebenfalls das Vorkommen zweier verschiedener Formen des Trypanosoma im Blute zu und konstatiert auch das Fortdauern dieses Dimorphismus im Anfange der Entwicklung im Darmkanale der *Glossina palpalis*.

Dagegen kommen BREINDL und MOORE in Beziehung auf *Trypanosoma gambiense, equiperdum* und *lewisi* zu entgegengesetzten Schlüssen; nach ihnen können Befruchtungserscheinungen, wenn sie bei Trypanosomen vorkommen, nur in einer Einwirkung des Blepharoplasts auf den Hauptkern bestehen, welche in der Einwanderung eines Teils der Substanz des ersteren ins Innere des zweiten bestünde. Diese Erscheinung bilde einen wichtigen Akt in der Entwicklungsreihe des Trypanosoma der Wirbeltiere.

BREINL und MOORE sehen in der Verschiedenheit der Bluttrypanosomen nur den Ausdruck aufeinander folgender Wachstumsphasen, indem sie bei keiner der — von ihnen studierten — Arten Anzeichen eines sexuellen Dimorphismus auffanden. — Sehen wir nun, was aus meinen Beobachtungen hervorgeht:

Der morphologische Dualismus des *Schizotrypanum cruzi* zeigt sich sehr deutlich in allen Entwicklungsphasen, sowohl beim Wir-

O descobrimento do tripanozômo da molestia do sono determinou tambem, pela maior importancia do assunto, visto tratar-se de molestia humana, numerozas investigações. Dellas vão rezultando, todos os dias, novos conhecimentos, sendo de esperar, seja brevemente rezolvido o importante problema.

Coube a BRUCE e CASTELLANI verificar experimentalmente o papel transmissor da *Glossina palpalis*, repetindo-se aqui fato similar ao da transmissão do nagana, pela *Glossina morsitans*, limitado o periodo infetante do diptero ás primeiras 48 hóras apoz a picada contaminante.

Outros fatos, especialmente a prezença de tripanozomos no organismo de glossinas recem-capturadas, cujo tubo dijestivo se aprezentava vazio de sangue, lavaram alguns pesquizadores a admitir um ciclo evolutivo do flajelado no diptero transmissor.

Foram assim as observações de KOCH a respeito do *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma gambiense* no tubo dijestivo de glossinas. Nestas KOCH distinguiu diferenciações de fórmas que julgava ligadas á diversidade de sexos. Experimentando ainda com o *Trypanosoma gambiense,* KOCH verificou estádios nas glossinas *fusca* e *tachinoides,* de 10 a 20 dias apoz a refeição contaminante.

Similares rezultados deram as pesquizas de STUHLMANN e KUDICKE sobre o *Trypanosoma brucei* na *Glossina fusca.* Para estes autores a evolução do parazito teria inicio pela multiplicação das fórmas indiferentes no intestino posterior, caminhando o tripanozomo dali para o intestino anterior, aonde teria lugar a fecundação e formação dos pequenos parazitos inoculaveis ao vertebrado. O estádio ultimo, porém, com parazitos na cavidade da tromba, só seria atinjido em 10 % das glossinas em experiencia.

Os trabalhos de MINCHIN, GRAY e TULLOCH deram rezultados muito interessantes. Verificaram na *Glossina palpalis,* estádios evolutivos do *Trypanosoma gambiense,* até o 4.º dia apoz a injestão contaminante, sendo a evolução, no *proctodæum,* pela diferenciação morfica do parazito em 2 tipos, interpretados pelos autores como sexos diferentes. Apoz

beltiere, als auch beim übertragenden Insekte. Es handelt sich um fundamentale Strukturdifferenzen, die sich besonders in der Form des Chromatins am Hauptkern und Blepharoplast aussprechen und sich nicht durch das Wachstum erklären lassen, da sie bei beiden Organismen im selben Entwicklungszustande vorkommen. So zeigt bei den Merozoiten der Schizogonieformen aus der Lunge einer derselben, den wir als weiblich ansehen, gleich zu Anfang den Blepharoplast vom Hauptkerne getrennt und in diesem ein viel kleineres Caryosom als bei den Formen, die ich für männliche halte; bei letzteren findet sich in dieser Phase die Substanz des Blepharoplasts noch mit derjenigen des Hauptkernes vereinigt. Auch bei den intraglobulären Formen und den freien Flagellaten im Plasma ist derselbe Dimorphismus deutlich erkennbar; er äussert sich, wie beschrieben, nicht nur in den mehr nebensächlichen, grösseren Verhältnissen des Plasma, sondern auch in der Struktur des Blepharoplasts, welcher in einem Falle ein kleines rundes — im anderen Falle ein grösseres, eiförmiges und fast stets quergelagertes Caryosom aufweist. Auch bei der Struktur des Kernes findet sich dieselbe Duplizität der Bildung, wobei die geringere Chromatinmenge bei einen, der als weiblich aufgefassten, Form hervorzuheben ist. Die jugendlichen Formen, deren Kerne das Chromatin in Form eines langen und längs gelagerten Bandes zeigen, lassen diesen Dimorphismus deutlich erkennen.

Im Organismus des *Conorhinus* zeigt sich die morphologische Dualität am deutlichsten bei den zwei Formen aus den Speicheldrüsen, indem die eine schmale einen grossen Blepharoplast und einen langen Kern aufweist, welcher der Längsachse des Parasiten entsprechend gelagert ist, während der andere, mit breiterem Plasmakörper am Hinterende, einen kleineren Blepharoplasten zeigt.

Ich kann natürlich aus den bei diesen Parasiten beobachteten Tatsachen keine allgemeinen Schlüsse ziehen, welche sich mit Sicherheit auf die Arten des Genus *Trypanosoma* anwenden liessen; doch können die in meinem Falle sehr deutlich beobachteten bio-

o 4.º dia, raramente depois do 5.º, os flajelados dezapareceriam do intestino, não sendo encontrados em qualquer dos orgãos da glossina. Em experiencias com *Stomoxys, Taeniorhincus* e outros dipteros, verificaram os pesquizadores fatos analogos, com mais rapido dezaparecimento dos flajelados.

Nas tentativas de transmissão os rezultados destes experimentadores não trazem ao assunto concluzões gerais decizivas. Só conseguiram infetar novos animais, fazendo-os picar pelas glossinas imediatamente apoz a injestão contaminante. MINCHIN, argumentando com as proprias observações e com as de outros pesquizadores, conclue pela existencia de ciclos evolutivos dos tripanozômos em hospedeiros especificos, não sendo a *Glossina palpalis* o transmissor natural do *Trypanosoma gambiense,* papel incumbido á *Glossina fusca,* segundo as experiencias de KOCH.

De interesse foi ainda nesses trabalhos, a verificação da prezença de 2 tripanozômos no tubo dijestivo das glossinas em liberdade, *Trypanosoma grevi* e *T. tullochi,* muitas vezes confundidos, pelos pesquizadores, com estádios evolutivos dos tripanozômos dos grandes mamiferos e do *Trypanosoma gambiense.*

As investigações referidas, indicando seguramente o papel transmissor das moscas, falavam mais em favor da simples veiculação do flajelado pelo diptero. Realmente, nas tentativas de transmissão experimental, a função infetante do inséto só era exercida num pequeno espaço de tempo apoz a picada contaminante, o que parecia indicar a auzencia do ciclo evolutivo. Outras observações, porém, vinham contradizer as que referimos, mostrando a deficiencia dos conhecimentos nellas adquiridos. De fato, das investigações de BRUMPT, LÉGER, BILLET e KEYSSELITZ rezulta o dezenvolvimento dos tripanozomos dos peixes e das rãs no organismo de hirudineos, só evoluindo certas especies de tripanozomos em determinadas sanguesugas, o que indicava a necessidade de condições biolojicas especiais.

Por outro lado, trabalhos fundamentais de SCHAUDINN sobre o *Haemoproteus* e os de v.

logischen Erscheinungen nicht sehr verschieden sein von den entsprechenden, aber noch wenig erforschten, die bei typischen Trypanosomen vorkommen.

III. DAS SCHIZOTRYPANUM IM ORGANISMUS DES CONORHINUS.

Die grundlegenden Forschungen über die vermittelnde Rolle blutsaugender Fliegen bei Trypanosomainfektionen wurden von BRUCE in seinen wertvollen Arbeiten über *Nagana* gemacht. Schon frühere Reisende in gewissen Gegenden Afrikas kannten ebensowohl, wie die Eingeborenen, die verderbliche Wirkung des Stiches der Tsetsefliegen, aber BRUCE zeigte zuerst durch Versuche die Uebertragung des Naganaparasiten, des *Trypanosoma brucei* durch die *Glossina morsitans.* So begann ein neues Kapitel in der Geschichte der Trypanosomen und es öffnete sich die Bahn für zahlreiche neue Untersuchungen über diesen Gegenstand; doch hat sich noch mancher wichtige Punkt der erwünschten Aufklärung entzogen. Die Entwicklungsgeschichte von *Plasmodium* und *Proteosoma* bei den Mücken deutete die Wahrscheinlichkeit ähnlicher Entwicklungsphasen bei Trypanosomen an. Doch wurde diese Ansicht seit den Arbeiten von BRUCE verlassen und durch die Annahme ersetzt, dass die Fliegen bei der Infektion rein mechanische Ueberträger darstellten. Zu diesem Schlusse führte die Beobachtung von BRUCE, dass *Glossina morsitans* nur in den ersten 48 Stunden nach ihrer Infektion (durch Stechen eines kranken Tieres) die Krankheit übertrug, was indessen nach neueren und wohl genaueren Untersuchungen nicht zutrifft.

Auch die Entdeckung des *Trypanosoma* der Schlafkrankheit führte infolge der grossen Wichtigkeit des Gegenstandes — handelte es sich doch um eine Erkrankung des Menschen — zu zahlreichen Forschungen, die täglich unsere Kenntnisse erweitern, so dass man eine baldige Lösung dieses wichtigen Problemes erwarten kann.

BRUCE und CASTELLANI war es vergönnt, die vermittelnde Rolle der *Glossina palpalis* festzustellen, wobei sich die bei der *Nagana*

PROWAZEK sobre o *Trypanosoma lewisi*, revelavam a existencia de ciclos sexuados nos dipteros transmissores.

V. PROWAZEK verificou, no estomago do *Haematopinus spinulosus*, copulação entre individuos de sexos diferentes, com a formação de ooquineto, do qual rezultaria por processos de divizão hetero-polar semelhantes aos descritos por SCHAUDINN, flajelados do tipo critidias.

Os rezultados de v. PROWAZEK foram confirmados nas investigações recentes de BALDREY (*Archiv. fur Protistenkunde*, 1909), destas rezultando mais o fato importante da transmissão do *Trypanosoma lewisi* a um rato indene, por um *Haematopinus*, cuja refeição infetante tivéra lugar 10 dias antes. Nesta verificação de BALDREY rejistra-se um fato de transmissão experimental indireta, apoz estádios evolutivos sistematicamente estudados, ficando aí excluida a veiculação mecanica do flajelado.

Concludentes tambem de um ciclo evolutivo no invertebrado são as recentes experiencias de KLEINE, que verificou a transmissão do *Trypanosoma brucei* pela *Glossina palpalis*, decorrido o prazo minimo de 10 dias, desde a injestão contaminante. Ha que assinalar, nas investigações deste pesquizador, a auzencia do poder infetante do diptero nos primeiros dias depois da picada, fato analogo ao da transmissão do plasmodio e do proteozoma, cuja evolução nos culícidas só se completa apoz determinado tempo. Nas experiencias sobre o *Trypanosoma gambiense* os rezultados de KLEINE são tambem decizivos, verificando o poder infetante das glossinas 20 dias depois de contaminadas, permanecendo infetantes indefinidamente. KLEINE acredita na existencia de faze sexual nos hospedeiros intermediarios, e descreve estádios morficos diversos do parazito, desde o intestino posterior, onde a evolução teria inicio, até as fórmas encontradas na tromba, inoculaveis nos vertebrados.

Os rezultados de E. ROUBAUD, membro da missão de estudos da molestia do sono no Congo francez, registram conhecimentos

gemachte Beobachtung wiederholte, indem die Uebertragung sich auf die ersten 24 Stunden nach der infizierenden Blutaufnahme beschränkte.

Neuere Beobachtungen — besonders das Vorkommen von Trypanosomen im Organismus frisch gefangener und kein Blut enthaltender Glossinen — führten andere Forscher zur Annahme eines Entwicklungszyklus des Flagellaten im Ueberträger. So war es bei den Beobachtungen von KOCH über das Verhalten von *Trypanosoma brucei* und *gambiense* im Verdauungstrakte der Glossinen, wobei er Formenunterschiede feststellte, welche er auf einen sexuellen Dimorphismus zurückführte. Indem er weiter mit *Trypanosoma gambiense* experimentierte, fand KOCH 10-20 Tage nach der Aufnahme infektiösen Blutes Entwicklungsstadien bei *Glossina fusca* und *tachinoides*.

STUHLMANN und KUDICKE erhielten ähnliche Resultate bei ihren Untersuchungen über das Verhalten von *Trypanosoma brucei* in der *Glossina fusca*. Nach diesen Autoren beginnt die Entwicklung durch Vermehrung der indifferenten Formen im Hinterdarme, von wo aus sie nach dem vorderen Abschnitte desselben auswandern, woselbst die Befruchtung und Bildung kleiner, auf Wirbeltiere übertragbarer Parasitenformen stattfinden soll. Doch soll das Endstadium — kleine Flagellaten im Innern des Rüssels — nur bei 10 % der benützten Glossinen erreicht werden.

Die Arbeiten von MINCHIN, GRAY und TULLOCH ergaben sehr interessante Resultate. Sie fanden nämlich bei der *Glossina palpalis* Entwicklungsstadien des *Trypanosoma gambiense* bis 4 Tage nach der Aufnahme parasitenhaltigen Blutes, wobei die Entwicklung im Proktodäum mit dem Auftreten zweier Typen begann, welche nach den Autoren verschiedenen Geschlechtern entsprechen. Nach dem vierten, oder nur selten, nach dem fünften Tage verschwanden die Flagellaten aus dem Darme der Glossinen und wurden auch nirgends in den anderen Organen gefunden. Bei Versuchen mit *Stomoxys*, *Taeniorhynchus* und anderen Zweiflüglern machten sie ähnliche Beobachtungen, wobei indessen die Flagellaten noch rascher verschwanden. Die

novos do mais alto interesse, chegando o autor, sobre alguns pontos do assunto, a concluzões de grande importancia.

Este autor considera 3 modalidades no mecanismo de transmissão dos tripanozomos pelas glossinas:

1. Transmissão direta, imediata, na qual as glossinas ajiriam como lancetas inoculadoras.
2. Transmissão indireta, apoz um periodo de evolução mais demorada, *sem fenomeno sexual;* caminhando nesta o flajelado do intestino posterior, séde de multiplicação ativa, para o *proctodaeum,* e para o canal da tromba.
3. Finalmente, evolução de natureza muito especial, realizada em parazitos morfolojicamente diferenciados, prezos ás paredes internas da tromba.

Nesta ultima modalidade supõe o autor a ocurencia de fenomenos de autogamia, analogos aos descritos nas amebas e em outros protozoarios; delles, porém, não encontrámos, nas descrições, demonstração convincente.

ROUBAUD considera a multiplicação ordinaria dos tripanozomos, verificada no tubo dijestivo de todas as glossinas, alimentadas em animais contaminados, como culturas do parazito, identicas ás obtidas no meio artificial de agar-sangue.

Neste ponto é interessante comparar os rezultados observados com diversas especies de tripanozômos (*brucei, gambiense, dimorphon, congolense, cazalboui,* etc.), verificando-se, assim, que o tempo de permanencia destas especies no tubo dijestivo das moscas é muito variavel, algumas das especies tendo aí pouco tempo de vida, quando outras perduram, em atividade e em multiplicação, até que dezapareçam todos os detritos da dijestão do sangue. De demoradas pesquizas conclue ROUBAUD pela auzencia de migração, das fórmas de cultura, do intestino médio para o anterior e para a tromba, não passando ellas tambem para a cavidade geral ou para qualquer outro orgam da glossina. Assim pois, não serão fórmas que possam infetar,

Uebertragungsversuche dieser Autoren gestatten keine entscheidende Schlüsse, da sie Tiere nur dann infizieren konnten, wenn sie dieselben durch Glossinen stechen liessen, welche soeben infektiöses Blut aufgenommen hatten. Gestützt auf eigene und fremde Beobachtungen schliesst MINCHIN auf das Vorkommen eines Entwicklungskreises der Trypanosomen bei specifischen Zwischenwirten. Für das *Trypanosoma gambiensi* wäre die *Glossina palpalis* nicht der natürliche Ueberträger, während diese Rolle nach den Versuchen von KOCH der *Glossina fusca* zufiele.

In diesen Arbeiten interessiert uns noch das Auffinden zweier Trypanosomen (T. GRAYI und T. TULLOCHI) im Darme frisch eingefangener Glossinen, welche von früheren Forschern häufig mit Entwicklungsstadien von *Trypanosoma gambiense* und verschiedenen Arten aus grossen Wirbeltieren verwechselt wurden.

Obgleich die besprochenen Untersuchungen die Rolle der Fliegen als Ueberträger völlig bestätigten, sprachen sie doch mehr zu gunsten einer einfachen mechanischen Uebertragung der Flagellaten. In der Tat beschränkte sich bei den Uebertragungsversuchen die Funktion der Insekten als Krankheitsvermittler auf eine kurze Frist nach dem Stechen eines infizierten Tieres, was das Bestehen eines Entwicklungszyklus auszuschliessen schien. Diesen Beobachtungen wurde jedoch durch andere widersprochen, welche die Mangelhaftigkeit jener Befunde zeigten. So ging aus den Untersuchungen von BRUMPT, LEGER, BILLET und KEYSSELITZ eine Entwicklung von Fisch- und Froschtrypanosomen im Organismus von *Hirudineen* hervor, wobei sich jede Art nur bei bestimmten Blutsaugern entwickelte, was die Notwendigkeit besonderer biologischer Bedingungen beweist. Andererseits zeigten die fundamentalen Arbeiten von SCHAUDINN über *Hämoproteus* und diejenigen von PROWAZEK über *Trypanosoma lewisi* das Vorkommen sexueller Entwicklungsreihen in den übertragenden Insekten. PROWAZEK fand im Magen von *Hämatopinus spinulosus* eine Kopulation zwischen Individuen verschiedenen Geschlechtes mit darauffolgender Bildung eines *Ookineten*, von wel-

por picada, os vertebrados sensiveis. Os aspétos destes flajelados não são semelhantes aos encontrados nas culturas do *Trypanosoma lewisi*, não se verificando os estádios em critidias; acredita o autor ser esse fato peculiar aos tripanozomos patojenicos.

Lembradas essas experiencias, no intuito de estabelecer paralelo entre ellas e os rezultados de nossos trabalhos, devemos referir ainda a opinião diverjente de alguns pesquizadores, especialmente a de NOVY e MAC NEAL, a de BREINL e MOORE, a de PATTON e a de ROSS.

NOVY e MAC NEAL contestaram os trabalhos de SCHAUDINN sobre o Hemoproteo, opinando, a principio, que se tratava de simples cultura de um tripanozomo da *Athene noctuae* no culex; mais tarde, depois da verificação, multiplas vezes repetida, de flajelados no trato intestinal de insétos, sugadores de sangue ou não, aquelles pesquizadores passaram a interpretar as fórmas flajeladas de SCHAUDINN como sendo parazitos naturais do culex, sem qualquer relação com os hemoparazitos da *Athene noctuae*.

Na infeção natural de hematofagos por flajelados das especies critidia e herpetomonas, NOVY e MAC NEAL encontram a cauza de erro em que supõem incididos outros pesquizadores, descrevendo o dezenvolvimento de tripanozomos de vertebrados no organismo dos insétos.

BREINL e MOORE julgam que o ciclo vital completo de um tripanozomo é realizado no organismo dos vertebrados. Bazea-se essa opinião na prezença de corpos de rezistencia nos orgãos de animais infetados, sendo o aparecimento dellas consecutivo a uma ação do blefaroplasto sobre o nucleo principal. Praa demonstrar ser dispensavel, na evolução dos tripanozomos, uma faze sexuada em invertebrados, lembram o cazo da durina, tripanozomiaze transmitida pelo coito.

PATTON, que tem trazido grande contribuição ao estudo de flajelados do tubo dijestivo de insétos sugadores, acredita que estes exercem, na transmissão dos tripanozomos de vertebrados, o papel simples de veícula-chem durch eine, der von SCHAUDINN beschriebenen ähnliche, heteropolare Kernteilung Flagellaten von *Crithidia*-typus erzeugt werden.

Die Befunde von PROWAZEK wurden bestätigt durch neuere Untersuchungen von BALDREY (Arch. für Protistenk., 1909); diese ergaben auch die wichtige Tatsache der Uebertragung des *Trypanosoma lewisi* auf normale Ratten durch Läuse, welche 10 Tage vorher infektiöses Blut gesogen hatten. Dieselben Beobachtungen erweisen auch die indirekte experimentelle Uebertragung — nach den systematisch studierten Entwicklungszuständen —, wobei eine mechanische Uebertragung des Flagellaten ausgeschlossen ist.

Auch die neueren Untersuchungen von KLEINE lassen auf einen Entwicklungszyklus beim Ueberträger schliessen; derselbe beobachtete die Uebertragung des *Trypanosoma brucei* durch die *Glossina palpalis* nach einer Minimalzeit von 10 Tagen nach der Aufnahme infektiösen Blutes. Dabei muss auch das Fehlen der Infektiosität der Fliege in den ersten Tagen hervorgehoben werden, in Uebereinstimmung mit der Uebertragung von *Plasmodium* und *Proteosoma*, zu deren vollständiger Entwicklung bei den Mücken eine bestimmte Zeit nötig ist. Auch bei den Versuchen über *Trypanosoma gambiense* waren die Ergebnisse von KLEINE entscheidend; er konstatierte die Infektiosität der Glossinen 20 Tage nach der Blutaufnahme; dieselbe erhielt sich unbeschränkte Zeit. KLEINE glaubt an das Vorkommen sexueller Phasen bei Trypanosomen in den Zwischenwirten und beschreibt verschiedene Parasitenformen, von denjenigen im Hinterdarme — wo die Entwicklung beginnen soll — bis zu den Formen, welche im Rüssel vorkommen und sich auf Wirbeltiere übertragen lassen.

Auch die Versuche von E. ROUBAUD, Mitglied einer Mission zum Studium der Schlafkrankheit im französischen Congo-Gebiete, ergaben wissenschaftliche Resultate von höchstem Interesse. Derselbe erörtert drei Modalitäten des Mechanismus bei der Uebertragung der Trypanosomen durch Glossinen: 1. Direkte, unmittelbare Uebertragung, bei welcher die Glossinen als Inokulationsinstrument die-

dores. Opinião identica é a de ROSS, que verificou, nas larvas e ninfas de culícidas, flajelados do genero critidia.

Vamos concluir agóra das nossas investigações:

Experimentando com larvas creadas no laboratorio e tendo excluido a infeção hereditaria de flajelados nellas, nossos rezultados escapam a objeção de ser possivel aqui tratar-se de flajelados naturais do hemiptero. Além de que, larvas testemunhas eram alimentadas em animais normais e nellas nunca encontrámos parazitos.

As experiencias testemunhas tornaram-se necessarias, *maxime* por termos verificado a a prezença de flajelados, no intestino médio, da quazi totalidade de conorrinos, colhidos nas habitações, o que levava a crêr fossem elles parazitos naturais do inséto. Em verdade, não estamos, por emquanto, habilitado a decidir sobre esse ponto, sendo possivel que os conorrinos, transmissores do *Schizotripanum cruzi,* sejam naturalmente parazitados por flajelados do genero critidia. Para explicar a infeção da totalidade de conorrinos por flajelados, admitindo que estes reprezentem sempre estádios evolutivos do *Schizotripanum,* fôra necessario supôr outro módo de contaminação do hemiptero, talvez a infeção das larvas pelos excrementos de hemipteros já infetados (LUTZ). Isso, porque a picada de vertebrados contaminados certamente não ocazionaria, com tanta constancia, infeção dos conorrinos. Verdade é que não existe diferença alguma morfolojica, entre os flajelados do tubo dijestivo das larvas infetadas no laboratorio e os dos conorrinos colhidos nas rezidencias humanas. Por outro lado, a inoculação em cobaias do material do intestino de larvas, experimentalmente contaminadas, forneceu-nos diversos rezultados positivos, falhando algumas vezes, o mesmo acontecendo aos flajelados do intestino de insétos recemcapturados. Seja como fôr, embóra devamos voltar a novas pesquizas para esclarecer amplamente a natureza dos flajelados do intestino de conorrinos em liberdade, nossas observações sobre o dezenvolvimento do *Schizotrypanum* acham-se izentas de qualquer

nen. 2. Indirekte Uebertragung nach einer längeren Entwicklungsperiode, aber ohne geschlechtliche Phase, bei welcher der Flagellat — nach aktiver Vermehrung im Hinterdarme — nach dem Vorderdarme und dem Kanale des Rüssels auswandert. 3. Endlich, eine Evolution von besonderer Art, welche sich an, der Form nach verschiedenen, Parasiten vollzieht, die den inneren Wänden des Rüssels anhaften. Bei letzterem Modus vermutet der Autor das Vorkommen von Autogamie, analog mit derjenigen, die bei Amoeben und anderen Protozoen beschrieben ist; doch fand ich in den Beschreibungen keinen überzeugenden Nachweis desselben.

ROUBAUD sieht in der gewöhnlichen Vermehrung der Trypanosomen, die im Darmkanal aller an infizierten Tieren ernährten Glossinen gefunden wurde, eine Kultur des Parasiten, welche mit derjenigen übereinstimmt, welche man auf Blut-Agar erhält. Dabei ist es von Interesse, die Resultate zu vergleichen, die man bei verschiedenen Arten von *Trypanosoma* (*brucei — gambiense — dimorphon — congolense — cazalboui* etc.) erhält; man konstatiert dabei, dass die Zeit der Permanenz im Darmkanale der Fliegen bei den verschiedenen Arten sehr variirt, indem einige daselbst nur kurze Zeit leben, während andere volle Aktivität und Vermehrung zeigen, bis die Reste des verdauten Blutes verschwinden. Aus lange dauernden Untersuchungen schliesst ROUBAUD auf das Fehlen einer Migration der Kulturformen vom Mitteldarme nach dem Vorderdarme und dem Rüssel; ebensowenig sollen sie nach der Leibeshöhle oder einem anderen Organ der Glossinen wandern. Demgemäss wären es Formen, welche nicht durch den Stich auf Wirbeltiere verimpft werden können. Die Bilder dieser Flagellaten gleichen keineswegs denjenigen in den Kulturen von *Trypanosoma lewisi*, indem hier die Crithidiaform nicht gefunden wird. Dieses Verhältniss ist nach der Meinung des Autors den krankheitserzeugenden Trypanosomen eigentümlich.

Nach Rekapitulierung dieser Versuche, zum Zweck der Vergleichung derselben mit meinen Ergebnissen, muss ich noch einige abweichende Meinungen erwähnen, besonders die-

objeção, uma vez que fôram praticadas no laboratorio em larvas aí nacidas.

Temos, em nossas experiencias, diversos rezultados pozitivos de transmissão do *Schizotrypanum cruzi* pelo conorrino, larva ou adulto, 10 ou mais dias depois da injestão contaminante. O prazo minimo, até agóra verificado, para que o inséto se torne infetante, é de 10 dias; quanto ao tempo de duração do poder infeciozo não o avaliámos ainda, sendo todavia longo, confórme rezulta de algumas experiencias. Fica, dest'arte, excluido o papel mecanico excluzivo do hemiptero, e mesmo que esse possa atuar como simples veículador na transmissão imediata do parazito, o que nunca verificámos, a função principal será de hospedeiro intermediario, no qual o flajelado passa por ciclo evolutivo, que se completa no prazo minimo de 10 dias.

No *Conorhinus*, o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta duas modalidades evolutivas bem distintas: uma dellas é constante e se observa sempre que o inséto suga vertebrado infetado, qualquer que seja. Desta o ultimo estádío é o de parazitos, com tipo de critidias, do intestino médio. As fórmas aqui encontradas são inteiramente analogas ás das culturas artificiais e as larvas, apezar de aprezentarem os parazitos no intestino, não são infetantes para outros vertebrados. Pensámos ser esse um dezenvolvimento identico ao das culturas em agar-sangue, não tendo elle nenhuma importancia na transmissão do *Schizotrypanum*. Cazo analogo é o referido nos trabalhos de ROUBAUD; no nosso cazo porém, devido ás condições anatomo-fiziolojicas especiais, os detritos da dijestão do sangue permanecem por muitos dias no intestino do conorrino sendo, por isso, longa a permanencia dos flajelados.

Não seria talvez inaceitavel a hipoteze de que esse dezenvolvimento reprezenta a multiplicação das fórmas indiferentes, admitindo com SCHAUDINN, a existencia dellas; ou será a multiplicação de fórmas femeas não fecundadas.

Verificámos muitas vezes, a auzencia de migração dos flajelados, do intestino médio

jenigen von NOVY und MAC NEAL, BREINL und MOORE, PATTON und die von ROSS.

NOVY und MAC NEAL traten den Arbeiten von SCHAUDINN über *Haemoproteus* entgegen, indem sie zuerst glaubten, dass es sich nur um die Kultur eins Trypanosoma der *Athene noctuae* in den Mücken handle; später nach vielfach wiederholtem Auffinden von Flagellaten bei blutsaugenden und anderen Insekten — glaubten diese Forscher die Flagellatenformen von SCHAUDINN als natürliche Parasiten der Mücke — ohne irgendwelche Beziehung zu den Blutparasiten des Kauzes — auffassen zu dürfen.

In einer solchen natürlichen Infektion blutsaugender Insekten durch Arten von *Crithidia* und *Herpetomonas* suchen NOVY und MAC NEAL die Ursache der Irrtümer, in welche ihrer Meinung nach andere Forscher verfielen, wenn sie die Entwicklung von Wirbeltiertrypanosomen im Organismus von Insekten beschrieben.

BREINL und MOORE glauben, dass der vollständige Entwicklungskreis eines Trypanosomas im Organismus der Wirbeltiere stattfindet. Sie stützen ihre Meinung auf das Vorkommen von Widerstandsformen in den Organen der infizierten Tiere; das Auftreten derselben sei die Folge einer Einwirkung des Blepharoplasten auf den Hauptkern (Autogamie). Sie erinnern an den Fall der Dourine, bei welcher die Trypanosomen durch Coitus übertragen werden, um zu beweisen, dass im Entwicklungskreise der Trypanosomen eine sexuelle Phase im Innern des Ueberträgers entbehrlich ist.

PATTON, der vielfache Beiträge zur Kenntnis der Flagellaten aus dem Darme von Insekten geliefert hat, glaubt, dass letztere bei der Uebertragung der Wirbeltiertrypanosomen die Rolle bloss mechanischer Ueberträger spielen. Dieselbe Meinung hat ROSS, welcher bei Larven und Nymphen von Culiciden Flagellaten des Genus *Crithidia* fand.

Ich komme nun zu den Schlüssen aus meinen eigenen Untersuchungen: Da ich mit Larven arbeitete, die im Laboratorium gezüchtet waren, auch eine erbliche Uebertragung der Flagellaten ausgeschlossen hatte, so ent-

para as partes anteriores do tubo dijestivo do inséto, examinando, logo apoz as refeições do *Conorhinus*, o conteúdo do intestino anterior. Aí não são encontradas, nesse momento, fórmas de critidias o que deveria acontecer si a infeção do vertebrado fosse determinada pela acensão, no ato da picada, dos flajelados do intestino médio até a tromba.

De acôrdo com esses fatos, os estádios de critidias, no *Conorhinus*, nenhuma significação tem para a infeção do vertebrado; reprezentam talvez, um retrocesso á condição larvaria primitiva, devido ás influencias do meio, podendo ainda servir, cazo haja infeção pelos excrementos, para manter a vida do protozoario nas gerações sucessivas de conorrinos.

Da outra modalidade de evolução, que reprezenta, a nosso vêr, o verdadeiro ciclo evolutivo do flajelado, eficaz na transferencia delle entre vertebrados, surpreendemos 4 estádios diversos: 2 no intestino anterior, reprezentados pelos organismos da Est. 12, Fig. 78-82 e pela fórma esquizogonica da Est. 12, Fig. 89, 1 na cavidade geral e o ultimo nas glandulas salivares.

Não conhecemos o determinismo do aparecimento destas fórmas; nossas experiencias, porém, mostram serem as duas primeiras observadas, com frequencia, nas larvas alimenmentadas em *Callithrix*, inicialmente infetados pelo hemiptero, ao passo que não conseguimos obtel-as quando experimentando com larvas infetadas em cobaias. Por outro lado, nas tentativas de transmissão pelas picadas do inséto, verificámos fatos similares, isto é, o poder infetante das larvas contaminadas nos *Callithrix* e a auzencia delle nas nutridas em cobaias, cuja infeção era produzida por inoculação de sangue.

Raciocinando sobre esses rezultados, somos levado a admitir uma condição especial do flajelado, da qual dependeria a ocurrencia do ciclo evolutivo sexuado, no organismo do inséto trsnsmissor. Para o *Schizotrypanum cruzi* aquella condição seria realizada no *Callithrix penicillata* e provavelmente no homem,

gehen meine Resultate dem Einwurfe, dass es sich um natürlich bei Hemipteren vorkommende Flagellaten handle. Ausserdem wurden andere Larven zur Kontrolle an gesunden Tieren ernährt, wobei immer die Parasiten fehlten.

Kontrollexperimente waren geboten, besonders, weil ich Flagellaten im Mitteldarme fast aller in Wohnungen gefangener Conorhinen fand, was dazu verleiten könnte, sie für natürliche Parasiten des Insektes anzusehen. In der Tat kann ich zur Zeit diese Frage nicht entscheiden, da es möglich ist, dass die Conorhinen, welche das *Schizotrypanum cruzi* übertragen, natürlich mit Flagellaten des Genus *Leptomonas (Crithidia)* infiziert sind. Zur Erklärung der Infektion sämtlicher Conorhinen durch Flagellaten — vorausgesetzt, dass diese Entwicklungsformen des *Schizotrypanum* darstellen — wäre es nötig, einen anderen Infektionsmodus bei den Wanzen anzunehmen, z. B. die Infektion der Larven durch die Exkremente bereits infizierter Individuen (LUTZ). Es ist nämlich kaum anzunehmen, dass das Stechen infizierter Wirbeltiere mit solcher Regelmässigkeit die Infektion der Conorhinen herbeiführen würde. Allerdings existiert kein Unterschied zwischen den Parasiten aus dem Darme im Laboratorium infizierter Larven und solcher von Conorhinen, die in menschlichen Wohnungen gefangen wurden. Andererseits ergab mir die Einimpfung von Material aus dem Darme experimentell infizierter Larven auf Meerschweinchen, neben einigen negativen, verschiedene positive Ergebnisse und dasselbe geschah bei Flagellaten aus dem Darme frisch gefangener Wanzen. Obwohl ich nun meine Untersuchungen wiederholen muss, um die Natur der Flagellaten aus dem Darme freilebender Conorhinen vollständig aufzuklären, so sind doch meine Beobachtungen über die Entwicklung des *Schizotrypanum* vollständig einwandsfrei, da sie mit im Laboratorium gezüchteten Larven angestellt wurden.

Ich erhielt bei meinen Versuchen über die Uebertragung des *Schizotrypanum cruzi* durch *Conorhinus* im erwachsenen oder Larven-Zustande verschiedene positive Resultate zehn-

sendo estes os hospedeiros capazes de infetar conorrinos que se tornariam infetantes. Devemos aqui referir as nossas ultimas observações a respeito da morfolojia do parazito no organismo das cobaias. Nas primeiras investigações realizadas em *Callithrix* e cobaias, era constante e muito evidente o dimorfismo do flajelado, confórme referimos e vem demonstrado em nossos dezenhos; actualmente, porém, talvez devido a repetidas passajens pelo organismo de cobaias, os parazitos se aprezentam, quazi sempre, com um unico aspéto morfico, não havendo agóra a primitiva evidencia do dimorfismo.

Como explicar essa mudança na morfolojia do parazito? Será uma adaptação lenta ao organismo da cobaia, rezultando daí a predominancia de uma fórma do esquizotripano, que seria a indiferente?

Devemos voltar a novas observações sobre esse fato, para dizer delle com segurança.

A influencia de certa condição dos tripanozomos, no sangue dos vertebrados, sobre a infeção dos insétos, vem admitida nos rezultados das pesquizas de KOCH. Este verificou tornarem-se infetantes as glossinas que sugavam vertebrados com pequeno numero de parazitos, ao passo que outras, alimentadas em animais com abundancia de tripanozômos, não adquiriam o poder transmissor. Assim, pois, nossa dedução, bazeada em diversas experiencias, incide na daquelle observador.

De grande importancia foi a nossa verificação de parazitos na cavidade geral e nas glandulas salivares do conorrino. Retiravamos o liquido da cavidade, amputando as pernas ou pela punção, com tubos capilares, do abdome, não podendo sofrer duvida a observação. Os insétos que aprezentavam fórmas parazitarias na cavidade geral mostraram, no intestino médio, fórmas de critidias, aí não sendo visto nenhum parazito com blefaroplasto posterior ao nucleo principal. Quanto aos flajelados das glandulas salivares, aprezentam aspéto morfolojico muito especial, diverso do verificado em todos os outros estádios da evolução. Nenhuma duvida temos que sejam aquellas as fórmas infetantes dos

oder mehr Tage nach der infektiösen Blutaufnahme. Bis jetzt sind 10 Tage der kürzeste Termin, der nach meinen Feststellungen nötig war, um dem Ueberträger die Eigenschaft der Infektiosität zu verleihen; wie lange letztere anhält, kann ich noch nicht angeben, doch beweisen mehrere Versuche eine lange Dauer derselben.

Auf diese Weise wird bei Conorhinus die Rolle des mechanischen Ueberträgers ausgeschlossen; wenn derselbe auch als einfacher Träger des Virus funktionieren könnte, was ich niemals beobachtete, so bliebe doch seine Hauptrolle diejenige des Zwischenwirtes, in welchem der Flagellat einen Entwicklungskreis durchmacht, zu dessen Vollendung ein Minimum von 10 Tagen nötig ist. Das *Schizotrypanum cruzi* zeigt beim *Conorhinus* zwei deutlich verschiedene Arten der Entwicklung; eine derselben ist konstant und wird immer beobachtet, wenn das Insekt ein infiziertes Wirbeltier beliebiger Art sticht; ihr letztes Stadium besteht in Parasiten des Mitteldarms von *Leptomonas*-typus (*Crithidia*). Die hier gefundenen Formen stimmen vollständig mit solchen aus künstlichen Kulturen überein und die Larven sind für andere Wirbeltiere nicht infektiös, obwohl sie Parasiten im Darme aufweisen. Ich halte diese Entwicklungsart für gleichwertig mit derjenigen der Blut-Agar-Kulturen und ohne Bedeutung für die Uebertragung des *Schizotrypanum*. Es ist dies ein analoger Fall mit dem oben von ROUBAUD berichteten, jedoch bleiben, wegen besonderer anatomischer und physiologischer Bedingungen, die Residuen der Blutverdauung längere Zeit im Darme des *Conorhinus*, was die lange Permanenz der Flagellaten erklärt.

Wie mir scheint, ist die Hypothese nicht ohne weiteres abzulehnen, dass diese Entwicklungsart eine Vermehrung der indifferenten Formen darstellt (wenn man mit SCHAUDINN das Vorkommen solcher annimmt); es kann sich aber auch um eine Vermehrung unbefruchteter weiblicher Formen handeln.

Das Fehlen einer Ueberwanderung der Flagellaten aus dem Mitteldarme nach den mehr nach vorne gelegenen Partien des Darmkanales habe ich oftmals festgestellt, indem

vertebrados; julgámos, porém, necessario praticar novas pesquizas para melhor esclarecimento desta faze.

O outro ponto, sobre o qual devemos insistir, é a natureza da divizão nuclear nos tripanozômos. BREINL e MOORE, uzando aliaz processos seguros de fixação e de coloração, julgam que a divizão do nucleo principal dos tripanozomos é amitozica, nunca tendo verificado os aspétos de mitoze referidos por V. PROWAZEK.

Estudando a multiplicação do parazito, no intestino do conorrino, tivémos oportunidade de referir fazes de mitoze bem evidentes. Posteriormente, no sangue periférico de uma cobaia, observámos uma figura de mitoze do nucleo principal, que rezolve, pela sua clareza, definitivamente a questão. (Est. 12, Fig. 88). Aí se observam duas placas secundarias (placas filhas) de cromozomios, situadas sobre o fuzo de substancia acromatica; no centro deste é vizivel o filamento central, em cujas extremidades se encontram os dois centriolos. Trata-se ainda, nesse cazo, de divizão precoce do nucleo, precedendo a esquizogonia no pulmão.

Rezumindo:

1.º O *Schizotrypanum cruzi* aprezenta, no organismo do conorrino, duas modalidades de dezenvolvimento, reprezentando a primeira simples cultura do parazito; a outra, provavelmente precedida de fenomenos sexuais não surpreendidos, será, talvez, o ciclo evolutivo, eficaz na transmissão entre os vertebrados.

2.º O *Conorhinus* é um verdadeiro hospede intermediario do *Schizotrypanum*, cujo ciclo é realizado num prazo minimo de 10 dias.

3.º Os flajelados, com tipo de critidias encontrados nos conorrinos em liberdade, podem reprezentar estádios culturais do *Schizotrypanum* ou serão parazitos excluzivos do inséto.

4.º A ocurrencia do ciclo evolutivo sexuado, no organismo do conorrino, depende de condição, não explicada, dos flajelados no sangue dos vertebrados.

ich bei den Conorhinen kurz nach der Nahrungsaufnahme den Vorderdarminhalt untersuchte. Man findet hier zu solcher Zeit keine *Crithidien*-formen, wie es sein müsste, wenn die Ansteckung der Wirbeltiere beim Stiche durch das Aufsteigen der Flagellaten aus dem Mitteldarme nach dem Rüssel stattfände.

In Uebereinstimmung mit diesen Tatsachen haben die *Crithidien*-stadien im Conorhinus keine Bedeutung für die Infektion des Wirbeltieres; vielleicht repräsentieren sie ein Zurückkehren zu einem phylogenetisch ursprünglichen Zustande als Folge der Einflüsse des Mediums; dabei könnten sie, wenn es eine Infektion durch Exkremente gibt, dazu dienen, das Leben der Protozoen auch in auf einander folgenden Generationen von Conorhinen zu erhalten.

Die andere Entwicklungsart vertritt meines Erachtens den eigentlichen Entwicklungszyklus des Parasiten, der bei seiner Uebertragung auf Wirbeltiere zur Geltung kommt; ich habe von demselben vier verschiedene Stadien angetroffen: zwei im Vorderdarm, nämlich die runden Formen (Taf. 12, Fig. 78—82), und die Schizogonieform (Taf. 12, Fig. 89), ferner eine aus der Körperhöhle und die letzte aus den Speicheldrüsen.

Die veranlassenden Umstände des Auftretens dieser Formen kenne ich noch nicht, doch zeigen meine Versuche die Häufigkeit des Vorkommens der beiden ersten bei Larven, welche an — ursprünglich durch Wanzen infizierten — *Callithrix*-affen gefüttert wurden. Dagegen konnte ich sie nicht erhalten, wenn ich mit an Meerschweinchen infizierten Larven experimentierte. Andererseits beobachtete ich ähnliche Verhältnisse bei Versuchen durch den Stich der Conorhinen, nämlich die Infektiosität der Larven, welche durch die Aeffchen infiziert waren und das Fehlen einer solchen bei Larven, welche an — durch Blutinjektion infizierten — Meerschweinchen genährt wurden.

Beim Ueberlegen dieser Ergebnisse sehe ich mich veranlasst, einen besonderen Zustand der Flagellaten anzunehmen, von dem das Auftreten eines geschlechtlichen Entwicklungszyklus im Organismus des Ueberträgers ab-

Ao terminar, cumprimos o grato dever de afirmar o maior reconhecimento ao nosso mestre e Diretor Dr. GONÇALVES CRUZ, a cuja orientação devemos o rezultado destas pesquizas. Somos ainda profundamente grato aos nossos mestres, Professores S. VON PROWAZEK e M. HARTMANN, de quem recebemos os melhores ensinamentos para concluzão deste trabalho. Tambem somos em extremo obrigado ao Dr. ADOLPHO LUTZ, cujo auxilio nos foi do mais alto proveito.

Tivemos sempre, como esforçado companheiro de trabalho na zona infestada pela nova especie morbida, o Dr. BELISARIO PENNA, a quem devemos os inestimaveis proveitos de um auxilio eficaz.

hängt. Für das *Schizotrypanum cruzi* fände sich dieser Zustand bei *Callithrix penicillata* und wahrscheinlich beim Menschen; sind doch diese die Wirte, welche die Conorhinen infektiös machen können.

Hier muss ich auch meine letzten Beobachtungen über die Morphologie des Parasiten im Organismus der Meerschweinchen anführen. Bei den ersten Untersuchungen, welche an *Callithrix* und Meerschweinchen vorgenommen wurden, war der Dimorphismus der Flagellaten konstant und in die Augen springend, wie aus meiner Darstellung und den Zeichnungen hervorgeht; heute dagegen — vielleicht als Folge wiederholter Meerschweinchenpassagen — zeigen die Parasiten fast immer eine einzige Form, ohne den ursprünglichen auffälligen Dimorphismus. Wie erklärt sich diese Veränderung in der Morphologie des Parasiten? Ist es eine langsame Anpassung an den Meerschweinchenorganismus, durch welche das Vorwiegen einer Form des *Schizotrypanum*, nämlich der indifferenten, zustandekommt? Um dies mit Sicherheit zu beantworten muss ich meine Beobachtungen in Hinsicht auf diese Frage wieder aufnehmen.

Der Einfluss eines bestimmten Zustandes der Trypanosomen im Blute der Wirbeltiere auf die Infektion der Insekten wird in den Resultaten der Forschungen von KOCH zugegeben. Derselbe stellte fest, dass Glossinen infektiös wurden, wenn sie Blut von Wirbeltieren mit wenig Parasiten sogen, während andere, die an Tieren mit grosser Parasitenzahl ernährt wurden, die Uebertragungsfähigkeit nicht erwarben. So stimmt meine auf andere Experimente basierte Schlussfolgerung mit der jenes Forschers überein.

Sehr wichtig war die Feststellung des Vorkommens von Parasiten in den Speicheldrüsen und dem Lacunom der Conorhinen. Ich entnahm die Flüssigkeit des letzteren durch Abschneiden der Beine oder Punktion des Abdomens mittelst Capillaren, sodass die Beobachtung einwandfrei ist. Die Wanzen, welche Parasiten des Lacunoms zeigten, boten im Mitteldarm nur *Crithidien*-formen, bei Fehlen vom Parasiten mit hinter dem Haupt-

kern liegendem Blepharoplasten. Die Flagellaten der Speicheldrüsen geben ein ganz besonderes morphologisches Bild, welches sich von allen anderen Entwicklungsstadien unterscheidet. Es ist für mich zweifellos, dass dies die für Wirbeltiere infektiösen Formen sind; doch glaube ich, dass zur vollständigen Aufklärung dieser Phase noch weitere Untersuchungen nötig sind.

Ein anderer Punkt, auf den ich eingehen muss, ist die Art der Kernteilung bei den Trypanosomen. BREINL und MOORE, welche im Uebrigen eine zuverlässige Färbungs- und Fixierungstechnik gebrauchten, glauben, dass die Teilung des Hauptkernes bei den Trypanosomen amitotisch sei, da sie niemals die von v. PROWAZEK angegebenen Mitosebilder feststellen konnten. Beim Studium der Vermehrung des Parasiten im Darme des Conorhinus hatte ich Gelegenheit, sehr deutliche Mitosestadien zu erkennen. Später beobachtete ich im peripherischen Blute eine Mitosefigur des Hauptkernes, welche durch ihre Deutlichkeit die Frage definitiv entscheidet (Taf. 12, Fig. 88). Man bemerkt bei derselben zwei sekundäre Platten von Chromosomen (Tochterplatten), welche auf einer achromatischen Spindel liegen; im Zentrum derselben erblickt man den Zentralfaden, an dessen Enden die zwei Centriolen sichtbar sind. Es handelt sich auch in diesem Falle um eine frühzeitige Mitose des Kernes, welche der Schizogonie in der Lunge vorausgeht.

Wenn ich noch einmal resummiere, so zeigt:

1. Das *Schizotrypanum cruzi* im Organismus des *Conorhinus* zwei Arten der Entwicklung, von denen die erste eine einfache Kultur des Parasiten darstellt, während die andere — wahrscheinlich durch nicht beobachtete sexuelle Vorgänge eingeleitete — vielleicht den richtigen Entwicklungszyklus zeigt, welcher bei der Uebertragung von Wirbeltier zu Wirbeltier in Tätigkeit tritt.
2. Ist der *Conorhinus* der eigentliche Zwischenwirt des *Schizotrypanum cruzi*, dessen Entwicklungskreis in einer Periode von 10 Tagen (im Minimum) abläuft.
3. Können die Flagellaten von *Crithidien*typus, welche in freilebenden Conorhinen vorkommen, Kulturstadien des *Schizotrypanum* darstellen oder ausschliessliche Insektenparasiten sein.
4. Hängt das Auftreten des sexuellen Entwicklungszyklus im Organismus der Conorhinen von noch unaufgeklärten Zuständen der Flagellaten im Blute der Wirbeltiere ab.

Zum Schlusse erfülle ich die angenehme Pflicht, unserem Direktor, Herrn Dr. GONÇALVES CRUZ meinen besten Dank auszusprechen. Seiner Leitung verdanke ich die Resultate meiner Untersuchungen.

Auch meinen Lehrern, den Herren Dr. S. von PROWAZEK und Dr. M. HARTMANN, von denen ich bei Vollendung dieser Arbeit vielfache Belehrung erhielt, bin ich sehr dankbar. Auch Herrn Dr. ADOLPH LUTZ, dessen Hilfe mir von grösstem Nutzen war, bin ich bestens verpflichtet.

In der Zone in welcher die neue Krankheitsform herrscht hatte ich beständig als Mitarbeiter Dr. BELISARIO PENNA, dem ich für seine unschätzbare Unterstützung meiner Nachforschungen verpflichtet bin.

ESTAMPA 9

ESTAMPA 9

Fig. 1. *Conorhinus megistus* BURM. transmissor de *Schizotrypanum cruzi.*
Fig. 2. Cabeça do *Conorhinus,* vista de perfil, mostrando a tromba sugadora.
Fig. 3. Ultimo segmento abdominal do ♂.
Fig. 4. Item da ♀.

Nota — Os traços entre os dezenhos 3-4 dão os tamanhos naturais dos insétos ♂ e ♀

TAFEL 9

Fig. 1. *Conorhinus megistus.* BURM. Ueberträger des *Schizotrypanum cruzi.*
Fig. 2. Kopf des *Conorhinus,* im Profil, den Saugrüssel zeigend.
Fig. 3. Letztes Abdominalsegment des ♂.
Fig. 4. Dasselbe des ♀.

Anmerkung — Die Striche zwischen den Zeichnungen 3 und 4 geben die natürliche Grösse beider Geschlechter an.

CASTRO SILVA
ad nat del.

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
TOMO I - 1909

ESTAMPA 9

2

1

3 ♂

♀ 4

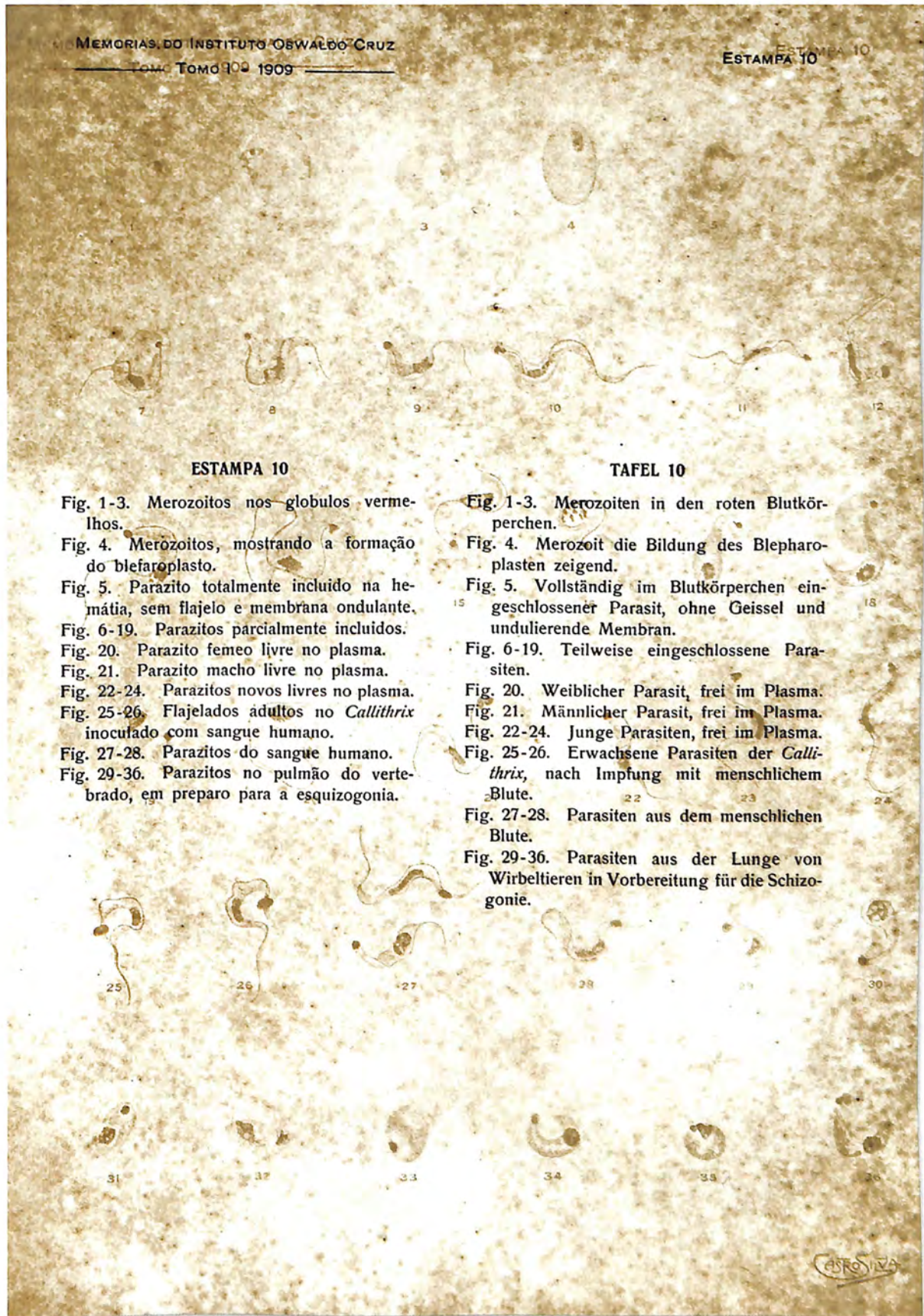
ad nat del

ESTAMPA 10

Fig. 1-3. Merozoitos nos globulos vermelhos.

Fig. 4. Merozoitos, mostrando a formação do blefaroplasto.

Fig. 5. Parazito totalmente incluido na hemátia, sem flajelo e membrana ondulante.

Fig. 6-19. Parazitos parcialmente incluidos.

Fig. 20. Parazito femeo livre no plasma.

Fig. 21. Parazito macho livre no plasma.

Fig. 22-24. Parazitos novos livres no plasma.

Fig. 25-26. Flajelados adultos no *Callithrix* inoculado com sangue humano.

Fig. 27-28. Parazitos do sangue humano.

Fig. 29-36. Parazitos no pulmão do vertebrado, em preparo para a esquizogonia.

TAFEL 10

Fig. 1-3. Merozoiten in den roten Blutkörperchen.

Fig. 4. Merozoit die Bildung des Blepharoplasten zeigend.

Fig. 5. Vollständig im Blutkörperchen eingeschlossener Parasit, ohne Geissel und undulierende Membran.

Fig. 6-19. Teilweise eingeschlossene Parasiten.

Fig. 20. Weiblicher Parasit, frei im Plasma.

Fig. 21. Männlicher Parasit, frei im Plasma.

Fig. 22-24. Junge Parasiten, frei im Plasma.

Fig. 25-26. Erwachsene Parasiten der *Callithrix,* nach Impfung mit menschlichem Blute.

Fig. 27-28. Parasiten aus dem menschlichen Blute.

Fig. 29-36. Parasiten aus der Lunge von Wirbeltieren in Vorbereitung für die Schizogonie.

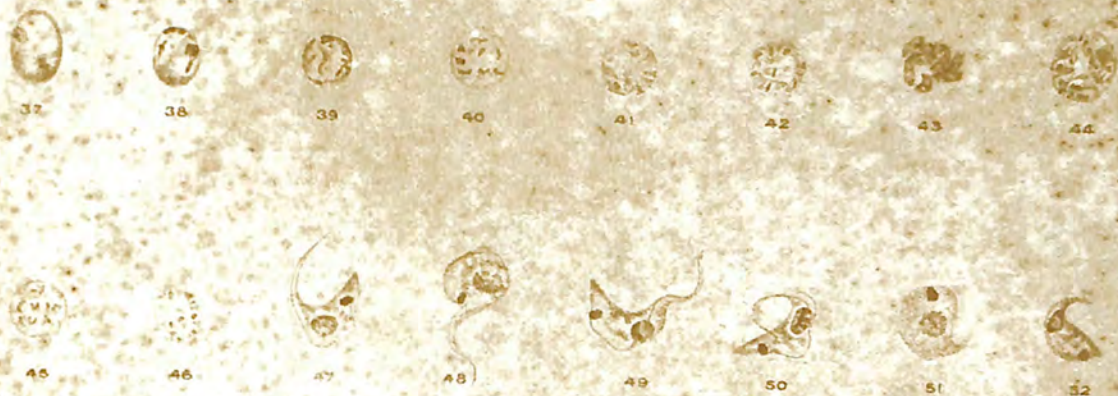
MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
TOMO I - 1909
ESTAMPA 10
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
CASTRO SILVA

ESTAMPA 11

Fig. 37-39. Fórmas iniciais da esquizogonia.
Fig. 40-46. Fórmas esquizogonicas no pulmão do vertebrado.
Fig. 47-60. Fórmas iniciais no intestino médio do *Conorhinus.*
Fig. 61-70. Fórmas de flajelados do intestino posterior do *Conorhinus.*
Fig. 71-73. Fórmas da cavidade geral do inséto.
Fig. 74-75. Fórmas das glandulas salivares.

TAFEL 11

Fig. 37-39. Anfangsformen der Schizogonie.
Fig. 40-46. Schizogonieformen aus der Lunge von Wirbeltieren.
Fig. 47-60. Initialformen aus dem Mitteldarme von *Conorhinus.*
Fig. 61-70. Flagellaten aus dem Enddarme des *Conorhinus.*
Fig. 71-73. Formen aus der Leibeshöhle des Insektes.
Fig. 74-75. Formen aus den Speicheldrüsen.

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
TOMO I - 1909
ESTAMPA 11
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
CASTRO SILVA

ESTAMPA 12

Fig. 76-77. Fórmas das glandulas salivares.

Fig. 78-82. Fórmas não interpretadas do intestino médio (zigotos?).

Fig. 83-86. Mitoze do nucleo e do blefaroplasto no intestino médio.

Fig. 87. Formação do flajelo. Fórma do intestino posterior do *Conorhinus*.

Fig. 88. *Schizotrypanum* no sangue. Mitoze do nucleo.

Fig. 89-97. Fórmas encontradas no intestino médio.

Fig. 98-109. Fórmas de culturas no meio NOVY e MC. NEAL.

Os dezenhos das estampas 10-11-12 foram feitos com Oc. 5. Obj. $^1/_{12}$ im. homoj. Z. de preparados fixados pelo alcool absoluto e coloridos pelo processo de GIEMSA.

TAFEL 12

Fig. 76-77. Formen aus den Speicheldrüsen.

Fig. 78-82. Unbestimmte Formen aus dem Mitteldarme (Zygoten?).

Fig. 83-86. Mitose von Nucleus und Blepharoplast im Mitteldarme des *Conorhinus*.

Fig. 87. Bildung der Geissel. Formen aus dem Hinterdarme des *Conorhinus*.

Fig. 88. *Schizotrypanum* im Blute. Kernmitose.

Fig. 89-97. Formen aus dem Mitteldarme.

Fig. 98-109. Formen aus den Culturen nach NOVY und MC. NEAL.

Die Zeichnungen der Tafeln 10-11-12 sind mit Oc. 5. Obj. $^1/_{12}$ Oelimm Z. nach mit absolutem Alkohol fixierten und nach GIEMSA gefärbten Präparaten gezeichnet.

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
TOMO I - 1909

ESTAMPA 12

76 77 78 79 80 81 82

83 84 87 88 89 90

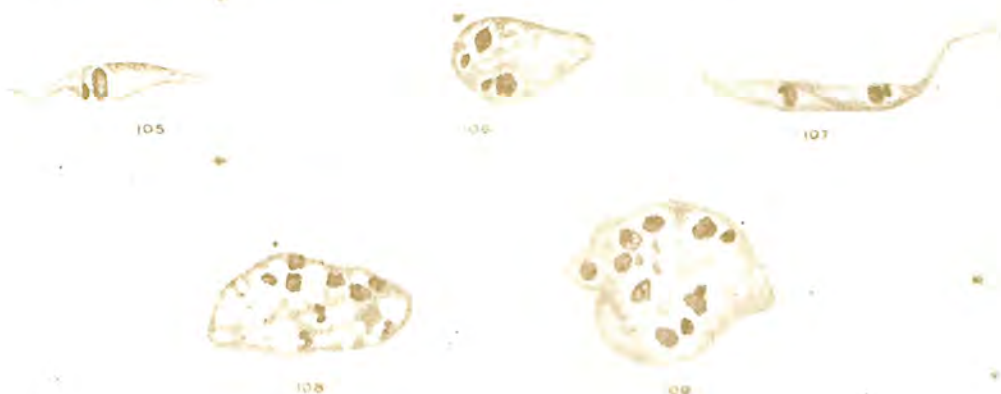
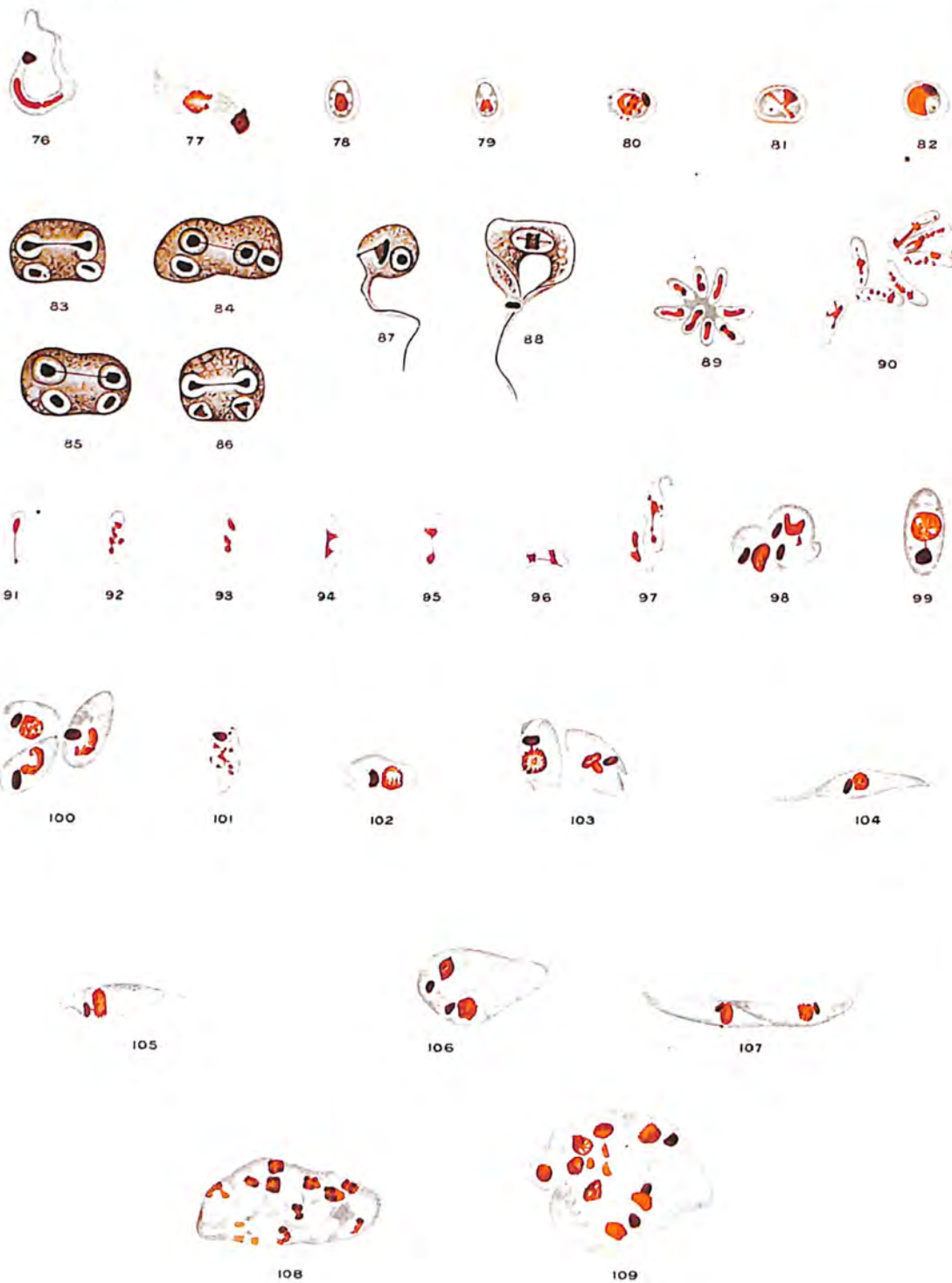
85 86

91 92 93 94 95 96 97 98 99

100 101 102 103 104

105 106 107

108 109

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
TOMO I - 1909

ESTAMPA 13

Preparados do *Schizotrypanum cruzi*. Fixação á humido pelo sublimado-alcool (SCHAUDINN). Coloração pela hematoxilina ferrea (ROSENBUSCH). Oc. compens. 18. Obj. imm. homoj. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 1. *Schizotrypanum* no sangue do *Callithrix*. Divizão do cariozoma. Estrutura do blefaroplasto.

Fig. 2-4. Item. Fórmas machas.

Fig. 5-8. Fórmas femeas no sangue de cobaia. Divizão do nucleo.

Fig. 9-11-12. Fórmas do intestino médio do *Conorhinus*. Formação do flajelo.

Fig. 10. Item. Mitoze terminal do nucleo e do blefaroplasto.

Fig. 13-20. Fórmas do intestino posterior do *Conorhinus*. Estrutura nuclear do blefaroplasto. Centriolo. Corpusculo bazal.

Fig. 21-22. Fórmas do intestino médio de larva de *Conorhinus*, 21 hóras apoz ter sugado animal infetado.

Fig. 23. Fórmas de cultura em meio NOVY-MC. NEAL.

Fig. 23a-24. Primeiras modificações do *Schizotrypanum* nas culturas artificiais.

Fig. 25-29. Esquizogonia no pulmão:

Fig. 25. Merozoitos machos.

Fig. 26. Merozoitos femeos.

TAFEL 13

Schizotrypanum cruzi. Die Präparate sind feucht mit Sublimatalkohol (SCHAUDINN) fixiert und mit Eisenhämatoxylin (nach ROSENBUSCH) gefärbt. Comp. oc. 18. Obj. Oelimm. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 1. *Schizotrypanum* im Blute von *Callithrix*. Teilung des Caryosoms. Struktur des Blepharoplasts.

Fig. 2-4. Item. Männliche Formen.

Fig. 5-8. Weibliche Formen im Blute des Meerschweinchens in Kernteilung.

Fig. 9, 11, 12. Formen aus dem Mitteldarme des *Conorhinus*. Bildung der Geissel.

Fig. 10. Item. Endstadium der Mitose des Nucleus und Blepharoplasten.

Fig. 13-20. Formen aus dem Enddarme des *Conorhinus*. Kernstruktur des Blepharoplasten. Centriol. Basalkörperchen.

Fig. 21-22 — Formen aus dem Mitteldarme der *Conorhinus*larve, 21 Stunden nach Aufnahme von Blut eines inficierten Tieres.

Fig. 23. Formen aus Kulturen nach NOVY und MC-NEAL.

Fig. 23-24. Erste Veränderungen des *Schizotrypanum* in den Kulturen.

Fig. 25-29. Schizogonie. (Lunge):

Fig. 25. Männliche Merozoiten.

Fig. 26. Weibliche Merozoiten.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz
Tomo I - 1909
Estampa 13
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
23 a
23 b
23 c
24
25
26
27
28
29
Castro Silva
ad. nat. del.

Comentários

Chagas, 1909: revisão de um artigo

João Carlos Pinto Dias
Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas
Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz

Trata-se do primeiro artigo expandido de Carlos Chagas sobre a doença que vinha de descobrir. Seguiu-se imediatamente à publicação de "Über eine neue Trypanosomiasis des Meunchen", nos *Archiv für Schiffs und Tropen Hygiene*, volume XIII, do mesmo ano. O trabalho das *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* é bilíngüe (português e alemão) e mais completo. Como assinala o título, nesse trabalho o dr. Chagas dedica-se prioritariamente aos estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*, por ele descoberto em Lassance, MG, no ano anterior, destinando pequeno espaço à doença humana propriamente dita. Esses estudos foram iniciados ainda na área endêmica, mas definitivamente completados em Manguinhos, entre setembro e dezembro de 1908, revelando um Carlos Chagas extremamente arguto e conhecedor da metodologia experimental, parceiro e seguidor de ícones como Oswaldo, Hartmann e Prowazek. A descoberta do primeiro caso humano ocorreria em 14 de abril de 1909, quando Chagas, já de volta a Lassance, intuía a existência da infecção humana em moradores de casas infestadas pelo *Conorhinus*. No texto em apreço, Chagas menciona brevemente as circunstâncias históricas da descoberta e refere previamente o encontro de um gato naturalmente infectado, além da descrição do seu caso número 01, a menina Berenice. Refere também outros dois casos em crianças da área, sem exame a fresco positivo, ambos com subinoculação positiva em cobaia, porém com detecção apenas de parasitos no pulmão. Também sucintamente, Chagas menciona o vetor invertebrado, seus hábitos de vida, sua hematofagia estrita e sua grande antropofilia, repassando ao colega Arthur Neiva a tarefa fundamental dos estudos entomológicos. *En passant*, menciona a condição pobre das choupanas infestadas, os hábitos noturnos do inseto, sua intensa fotofobia e sua permanência apenas nas moradias habitadas por humanos. Encontra formas em critídia no intestino do inseto e estabelece, a princípio, duas hipóteses de evolução: a) o flagelado é restrito ao hemíptero; b) o barbeiro é apenas um hospedeiro intermediário e o parasito evolui em organismos superiores. A segunda hipótese é assumida com base nos trabalhos em laboratório, quando o tripanossoma é inoculado em mamíferos diversos (sagüis, cobaias e cães), revelando-se patogênico e assumindo formas evolutivas de tripanossoma, no sangue,

e leishmania em tecidos. A possibilidade de nova entidade mórbida do homem se baseará na grande antropofilia do inseto. No texto, Chagas informa a estratégia de buscar o parasito no sangue periférico de pessoas e animais habitantes de casas infestadas pelo *Conorhinus*, "desde logo verificando a existência de tripanozomida no sangue periférico do gato" (p. 162).

A infecção no homem é comprovada em Berenice, por exame a fresco. Os outros dois pacientes relatados em 1909 (José e Joaquina) não aparecerão na lista definitiva dos casos agudos de Lassance, publicada sete anos depois (Chagas, 1916). No texto de 1909, o autor informa que a história clínica da nova entidade era ainda "muito deficiente", por falta de um acompanhamento longitudinal maior, à data. Não obstante, caracteriza clinicamente bem o caso agudo, mencionando a febre, o ingurgitamento ganglionar, o edema generalizado, a hepato-esplenomegalia e o edema subpalpebral, além de irritabilidade e prostração. Nesse trabalho não serão referidas alterações cardíacas, meningoencefálicas ou da tireóide, assim como não se menciona a fase crônica da infecção. Chagas ressalta a elevada letalidade em seus pequenos mamíferos inoculados, particularmente os mais novos, e menciona a grande mortandade de crianças nas zonas infestadas pelo hemíptero. Isola o parasito de Berenice em sagüis e também o isola de triatomíneos, comprovando a infecção destes. As técnicas de cultura e coloração dos parasitos são passadas a Chagas principalmente por Giemsa, Max Hartmann e S. Von Prowazek, que se encontravam em Manguinhos à época. O descobridor também se refere, com gratidão, à ajuda nas pesquisas dada por Oswaldo, Belisário Penna e Adolpho Lutz; este último estudara tripanossomatídeos brasileiros alguns anos antes. Chagas menciona alguns hábitos do vetor, cujo estudo mais pormenorizado é entregue ao colega Arthur Neiva, autor de uma primeira publicação nas *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Neiva, 1910).

No estudo do parasito, Chagas pontualiza as observações no inseto e nos hospedeiros vertebrados. Seu primeiro achado, em 1908, refere-se a critídias (epimastigotas) detectadas no vetor, especialmente no trato digestivo. Tendo denominado o parasito como *Trypanosoma cruzi* no texto alemão, é no trabalho das *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* que ele cria o gênero *Schizotrypanum*, baseando-se no "modo de envolver todo particular deste protozoário" (p. 161 § 3). Na página 167, passa à descrição minuciosa da nova espécie, inicialmente a partir dos hospedeiros vertebrados, em que identificará duas formas evolutivas: "a de organismos intraglobulares e a de flagelados livres no plasma" (p. 167 § 4). Destaca a inclusão do parasito em glóbulos vermelhos, onde apresenta dualismo morfológico. No sangue humano, refere-se a formas flageladas com grande blefaroplasto posicionado posteriormente ao núcleo ovóide, com cromatina intensa e evidente membrana ondulante. Outra forma teriam o blefaroplasto menor e o núcleo esférico, o que leva Chagas a acreditar que se trata de formas de evolução. No *Callithrix*, refere-se a aspectos similares aos encontrados no sangue humano, mas parece a Chagas que, neste modelo, podem ocorrer flagelados com núcleo e blefaroplasto em tamanho maior. Em algumas preparações, o autor observou parasitos com núcleo em situação de mitose. Pela organização idêntica do núcleo e do blefaroplasto, Chagas adere às teorias de Schaudinn, ao considerar o blefaroplasto como segundo núcleo, o "núcleo locomotor dos tripanozomidas" (p. 173 § 2). Foi, porém, na cobaia que Chagas referiu ter feito suas principais observações de hospedeiros vertebrados. No sangue, divisou novamente as formas livres e no interior das hemácias. Nas formas intraglobulares, afirma que podem estar ainda ausentes o flagelo e a membrana ondulante. Nesse ponto, Chagas refere-se com destaque à esquizogonia do parasito no pulmão dos animais infectados, anotando vários detalhes do processo reprodutivo. Com a múltipla segmentação nuclear, haverá formação de merozoitos, os quais apresentarão indivíduos machos e fêmeas, sendo

estas de menor tamanho. Os pequenos indivíduos resultantes da esquizogonia escaparão da membrana envolvente e ganharão a corrente sangüínea, onde penetrarão nas hemácias, aí se transformando em flagelados. Chagas faz suas observações com base em preparações coradas pelo Giemsa e reproduzidas em câmara clara (várias pranchas anexadas), mas adverte sobre "a necessidade de preparados muito bem sucedidos para o estudo das formas jovens intraglobulares" (p. 179 § 2). Sobre a evolução no inseto, indica que a maioria das observações foi feita em larvas jovens criadas em laboratório, as quais assinala nascerem livres do parasito. Analisa previamente a dinâmica alimentar e o processamento digestivo do triatomíneo, informando as características do conteúdo digestivo e a permanência de sangue no intestino quilífico até cinco dias da ingestão. Descreve a perda do flagelo e a formação de formas arredondadas de núcleo central, de rápida reprodução, às vezes formando grandes massas aglomeradas. Particulariza as variações de volume e intensidade de cromatina, assim como a formação do aparelho flagelar e as diversas posições do blefaroplasto com relação ao núcleo. Mostra a variedade de formas ao longo do sistema digestivo e refere a divisão longitudinal de indivíduos esféricos e critídias. Refere ainda critídias plurinucleadas e divisões celulares incompletas, além de divisões esquizogônicas no intestino médio do inseto, similares àquelas observadas no pulmão de cobaias "e também em alguns estádios jovens do flagelado no sangue" (p. 190 § 2). Em seguida, menciona o encontro de formas flageladas na cavidade geral do *Conorhinus* naturalmente infectados, fato que, anos depois, Emmanuel Dias também comprovou (Dias, 1932, 1933). Chagas interpretou isso como fase intermediária do parasito no vetor, em demanda das glândulas salivares (p. 191 § 4). Em seguida, dedica-se mais detidamente ao encontro do parasito em glândulas salivares do inseto, que considerou "formas de evolução do *Schizotrypanum cruzi*, as quais representam, sem dúvida, os organismos que são inoculados no vertebrado" (p. 191 § 5). As principais formas descritas são longas e com blefaroplasto posterior ao núcleo, mas Chagas observou também formas arredondadas sem flagelo ou membrana ondulante. Em outros triatomíneos, no entanto, não encontrou o parasito nas glândulas salivares, referindo ainda que, em observações colhidas em triatomíneos procedentes de residências infestadas, as tentativas de infecção por picada só foram exitosas em pequena proporção (p. 192 § 3).

Chagas consegue facilmente a cultura do parasito em meio ágar-sangue, segundo o método de Novy e Mac-Neal. Aí, em material fecal de triatomíneos infectados, observa em algumas horas a produção de organismos arredondados e aflagelados, que originam formas alongadas semelhantes às do inseto, ambas as formas sendo capazes de se multiplicar por divisão binária. A evolução é para formas de critídias adultas, que podem se tornar aberrantes em culturas antigas.

Sobre a transmissão do flagelado a mamíferos, a partir do inseto vetor, Chagas se posiciona desde o início favoravelmente à idéia de que ocorre transmissão anterior, pela picada. Parte das primeiras observações com *Callithrix*, iniciadas por Oswaldo Cruz. De permeio, consegue várias infecções de ninfas criadas em laboratório, fazendo-as sugar em monos e cobaia infectados (p. 195 § 3 e 4), nisto antecedendo à descrição clássica de Brumpt sobre o xenodiagnóstico (Brumpt, 1914). Observando os triatomíneos de campo, Chagas registra grande variabilidade de taxas de infecção natural, conforme a procedência dos insetos. A apuração da transmissão ao mamífero pela picada do vetor se faz basicamente pelo estudo anatomopatológico dos pulmões de cobaias; mais tarde esclareceu-se que se tratava de infecção por *Pneumocistis carini* e não por *T. cruzi*, fato que Chagas acabou aceitando. Chagas também observa que nem todas as picadas são infectantes, diferentemente do que ocorre quando da inoculação direta de conteúdo digestivo de triatomíneos infectados em animal

sensível. Como um resumo de suas observações até então, Chagas destaca quatro pontos sobre a transmissão da infecção (p. 196 e 197):

> 1. Certa proporção, indeterminada, de conorrinos colhidos nas habitações de zona contaminada, é infectante para os vertebrados;
>
> As larvas criadas no laboratório e alimentadas em animais contaminados, mesmo com numerosos parasitos no sangue periférico, nem sempre se tornam infectantes, apesar de apresentarem flagelados no intestino médio;
>
> As larvas que, em tal caso, se tornam contaminantes, só o são desde o 8º. ou 10º. dia após a refeição de sangue infectado, conservando esta condição por espaço de tempo longo, ainda indeterminado;
>
> As picadas de larvas 2 ou 3 dias depois de uma refeição em animal infectado, não contaminam os vertebrados.

A pesquisa com inoculação de material de cultura em animal sensível também se mostra com resultados ora positivos, ora negativos, fato que Chagas assinala como ainda não esclarecido e a demandar novas pesquisas (p. 197 § 5).

Adiante, Chagas assinala com precisão a variabilidade da virulência do *S. cruzi*, conforme diferentes fatores que se propõe a estudar. Dentre esses, particulariza a múltipla passagem por animais sensíveis, com efeito atenuador, notando retomada da virulência com passagem em animais suscetíveis de outra espécie. Observa ainda que a via de inoculação é importante para o resultado das experiências, sendo mais rápidas e mortais as infecções a partir de inoculação intraperitoneal (p. 198 § 3). Chagas termina essa parte do trabalho recapitulando a evolução clínica nos animais de experimentação, sublinhando a febre, o poliglobulismo sangüíneo, o enfartamento ganglionar, eventuais convulsões e as alterações conjuntivais encontradas nos sagüis (p. 199 e 200).

Chagas termina o trabalho com longa e minuciosa discussão dos aspectos estudados, a partir da página 200, ponto em que revelará de fato a sua excelente formação e atualidade em protozoologia e medicina experimental, por meio de diversas citações de autores da época sobre os diferentes assuntos abordados. Embora reitere a parceria e a gratidão aos seus mestres em Manguinhos, Chagas assina sozinho o artigo, certamente por sugestão de Oswaldo Cruz, que sempre atribuiu ao mineiro a autoria única da descoberta (Chagas Filho, 1993). Em particular, Chagas defende com maestria a criação do novo gênero, que mais tarde Emmanuel Dias retomou ao defender o *Schizotrypanum* (Dias, 1933, 1934) e Hoare também justificou, ao fixar o subgênero (Hoare, 1972). No tocante à evolução no inseto, Chagas mostra grande familiaridade e atualidade sobre a tripanossomíase africana, também discutindo o ciclo de *Haemoproteus* e de *T. lewisi*, conhecimentos certamente indutores de suas idéias sobre a transmissão salivar do novo parasito. O autor também retoma sua postulação inicial sobre o papel definitivo dos vertebrados ao fim do ciclo do parasito, ao analisar sua morfologia nos dois hospedeiros, à luz das teorias evolutivas de diversos autores (p. 211 e 212). Nesse ponto, ainda que reiterando sua crença na transmissão salivar a partir do inseto, Chagas já admite dúvida sobre a possibilidade de transmissão posterior, encarecendo novas pesquisas com este objetivo (p. 212 § 3). Aliás, ele ressalta esse ponto ao final do trabalho (p. 216), ao informar que no inseto (hospedeiro intermediário) as critídias do aparelho digestivo representam uma forma de cultura do *S. cruzi*, em paralelo com um ciclo evolutivo eficaz de transmissão, antecedido de "fenômenos sexuais não surpreendidos" (p. 216 § 4).

No conjunto vê-se um trabalho brilhante, realizado em tempo recorde e em condições nem sempre ideais por um pesquisador atento, metódico e altamente reflexivo. Em sua maioria, as observações e especulações apresentadas são pertinentes e foram comprovadas ao longo destes cem anos. Os principais equívocos detectados no trabalho correspondem à transmissão pela picada, aos fenômenos esquizogônicos e à afecção pulmonar em cobaias, o que deve ser relativizado em face dos inúmeros acertos e das dificuldades técnicas da época. A questão da sexualidade do parasito foi posta em evidência por Chagas e tem sido revista por pesquisadores atuais. Em sua interpretação, o descobridor foi provavelmente induzido por sua excepcional formação em malária e pelas formas e figuras detectadas em suas preparações. Embora convencido de seus achados, Chagas é cuidadoso e prudente na análise, referindo-se por mais de uma vez à necessidade de repetição e aperfeiçoamento dos experimentos, com técnicas adequadas. No tocante à descrição clínica de seu primeiro caso agudo, tem o cuidado de informar que se trata de uma observação preliminar, mas apresenta com acerto o quadro geral da infecção, o que contraria frontalmente a insinuação de Delaporte (1995), de que seria uma descrição oportunista e mentirosamente calcada no que já era conhecido para a tripanossomíase africana (Coutinho & Dias, 1999).

Ao ensejo das comemorações do centenário da sua descoberta, o trabalho em análise é oportuno e atual. Nele Carlos Chagas, uma vez mais, se mostra à altura dos maiores pesquisadores de sua época, um orgulho para a ciência pátria e mundial (Coura, 1997; Coutinho & Dias, 1999). Há que se relevar, em particular, a assistência e concordância de seus mestres europeus, à ocasião em Manguinhos e estimuladores entusiásticos da obra de Chagas. Não poderiam as *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* ter inaugurado sua histórica caminhada de maneira mais auspiciosa do que com essa primeira publicação.

REFERÊNCIAS

BRUMPT, E. O xenodiagnóstico: aplicação ao diagnóstico em algumas infecções parasitárias e em particular à tripanossomose de Chagas. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia*, 3: 97-102, 1914.

CHAGAS, C. R. J. Über eine neue Trypanosomiasis des Meunchen. *Archiv für Schiffs und Tropen Hygiene*, XIII: 120-122, 1909.

CHAGAS, C. R. J. Tripanossomíase americana: forma aguda da moléstia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 8: 37-67, 1916.

CHAGAS FILHO, C. *Meu Pai*. Rio de Janeiro: Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz, 1993.

COURA, J. R. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre a doença de Chagas. *In*: DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. (Orgs.). *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

COUTINHO, M. & DIAS, J. C. P. A descoberta da doença de Chagas. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, 16: 11-55, 1999.

DELAPORTE, F. Chagas: a lógica e a descoberta. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, 1: 39-53, 1995.

DIAS, E. O *Trypanosoma cruzi* pode evoluir na cavidade geral do *Triatoma megista* (nota prévia). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 26: 83-84, 1932.

DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*, 1933. Tese, Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina.

DIAS, E. *Trypanosoma cruzi* ou *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 29: 203-205, 1934.

HOARE, C. *The Trypanosomes of Mammals*. Oxford: Blackwell Scientifical Publ., 1972.

NEIVA, A. Informações sobre a biologia do *Conorhinus megistus* Burm. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2: 206-212, 1910.

Relevância do Trabalho Pioneiro de Carlos Chagas que Descreve a Descoberta da Nova Tripanossomíase Humana

José Rodrigues Coura
Laboratório de Doenças Parasitárias
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Quatro meses antes da descrição completa da genial descoberta de Carlos Chagas, ele publicou, com data de 15 de abril de 1909, uma "Nota prévia" intitulada "Uber eine neue Trypanosomiasis des Menschen" nos *Archiv für Schiffs und Tropen-Hygiene* da Alemanha e um sumário em português no *Brasil Médico*, visando naturalmente a obter a prioridade da descoberta. Em agosto daquele ano ele publica o trabalho completo "Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem" nas *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, também em português e alemão. O trabalho, que relata uma das maiores descobertas de toda a história da biologia e da medicina, consta de uma introdução e de seções que tratam da infecção do homem, da morfologia e evolução do *Schizotrypanum cruzi* no organismo dos vertebrados, do vetor e de animais de experimentação, em cultura, dos mecanismos de transmissão, das variações da virulência parasitária e sua evolução nos animais de laboratório, e finaliza com considerações gerais, em que o autor discute a sistemática, o dimorfismo sexual do parasito e sua evolução, com um resumo pontual sobre o parasito e seu vetor. Ao final, 109 figuras coloridas, reunidas em estampas, mostram o vetor e as diversas fases evolutivas de parasito.

Na introdução, Chagas faz uma excelente descrição do comportamento do vetor, da família Reduvidae, na época considerado do gênero *Conorhinus* espécie *megista*, hoje conhecido como *Panstrongylus megistus*, o qual, segundo o autor, "habita os domicílios humanos, atacando o homem à noite, depois de apagadas as luzes, ocultando-se, durante o dia, nas frestas das paredes, na cobertura das casas, em todos os esconderijos, enfim, onde possa encontrar guarida". Acrescenta ainda que o hematófago somente permanece nas habitações enquanto aí existe o homem, abandonando-as em função da ausência de alimentação, quando aquele delas se afasta em caráter permanente. A precisão dessa descrição e a perfeição da linguagem nos dão uma exata compreensão do comportamento do hematófago, tal como o conhecemos até os dias atuais nas áreas endêmicas. Em seguida, o autor descreve o encontro de flagelados com as características de critídias no intestino do vetor, o qual envia ao diretor do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) para tentar infectar o *Callithrix penicillata*, uma vez que em Lassance não havia as condições de laboratório para fazê-lo. Ao mesmo tempo, solicita um estudo da

biologia do vetor ao dr. Arthur Neiva, chefe da Seção de Zoologia do instituto, que melhor conhece o assunto e, quando oportuno, apresenta um conhecimento mais exato. Observem a elevada qualidade científica de Carlos Chagas, reconhecendo em seu chefe, o dr. Oswaldo Cruz, e em seu colega Arthur Neiva a capacidade de desenvolver aquelas fases do trabalho: ele mesmo poderia fazê-lo posteriormente, mas preferiu, de forma consciente e confiante, a colaboração científica do seu colega de trabalho e a ajuda do seu chefe, que sempre o reconheceram como autor da descoberta.

Ao receber os exemplares dos vetores infectados que lhe enviara Carlos Chagas, Oswaldo Cruz os colocou, como solicitado, em contato com um *Callithrix penicillata*, o qual 21 dias após apresentou o parasito na corrente sangüínea. Imediatamente Oswaldo Cruz comunica o achado a Carlos Chagas e o chama para retornar ao instituto e retomar a pesquisa experimental. Embora a impressão da época tenha sido a de que os vetores houvessem transmitido a infecção ao *Callithrix* pela picada, acredito que ele tenha se infectado pela ingestão dos triatomíneos, como ocorre na natureza. Se minha interpretação for correta, essa pode ser considerada a primeira demonstração da transmissão por via oral da infecção pelo *T. cruzi*, hoje bem conhecida nos surtos epidêmicos que vêm ocorrendo em diversas regiões, principalmente na região amazônica.

No tópico "Infecção do homem", Carlos Chagas inicia dizendo que a história clínica da nova entidade mórbida era ainda muito deficiente, uma vez que não se conhecia a evolução da doença e sua sintomatologia completa. Destaca a anemia profunda, o retardamento na evolução das crianças, a febre, o edema generalizado e o enfartamento ganglionar, principalmente da cadeia cervical. Enfatiza a esplenomegalia, a qual relaciona à concomitância com a malária, que na época era endêmica na região de Lassance. Impressiona-se com a precária condição intelectual dos pacientes, muitos dos quais em nível de imbecibilidade, e com as manifestações neurológicas, que sabemos hoje serem relacionadas ao bócio endêmico por carência de iodo na alimentação daquela região e de outras no interior do nosso país. Chama a atenção para a grande letalidade de crianças na área estudada, referindo-se à freqüência das convulsões infantis, provavelmente relacionadas à forma aguda grave com quadros de meningoencefalite pela doença, manifestação clínica que leva a uma elevada taxa de mortalidade reconhecida posteriormente pelo autor, que estabelece uma perfeita correlação entre "os barbeiros" infectados com o parasito e a sua presença no sangue periférico das pessoas com a doença na fase aguda e nos animais de experimentação inoculados com o sangue desses pacientes. No final do tópico descreve minuciosamente os três primeiros casos da doença: Berenice, de 2 anos de idade, José, de 8 anos, e Joaquina, de 6 anos.

Segue no extenso trabalho com uma detalhada descrição sobre a morfologia e evolução do *Schizotrypanum cruzi* no organismo dos vertebrados, no sangue periférico do homem; do *S. cruzi* de origem humana no sangue do *Callithrix penicillata*; no organismo da cobaia e no intestino do vetor, onde chega ao máximo de detalhes, ilustrados com diversas pranchas e figuras, correspondentes aos diversos seguimentos do aparelho digestivo do inseto. Faz uma breve discussão sobre o cultivo do parasito no meio de Novy e MacNeal, mostrando a diversidade parasitária nos preparados corados pelo Giembsa. Discute a transmissão da infecção pelo *Conorhinus*, por inoculação dos flagelados do intestino do vetor nos vertebrados e obtidos de cultura, assim como a variabilidade da virulência do parasito e sua evolução nos animais de laboratório. Finalmente, Chagas sintetiza a sistemática do parasito, seu dimorfismo sexual, ainda hoje discutido, o *S. cruzi* no organismo do hemíptero, tecendo considerações sobre a opinião de diversos autores sobre outros tripanossomas, particularmente do *Trypanosoma brurcei* na *Glossina*, comparando-o com o *S. cruzi* no *Conorhinus*, o que revela seu profundo conhecimento sobre o assunto.

Ao finalizar esta breve análise da maior e mais completa descoberta de todos os tempos, na qual um mesmo autor descreve um parasito, a doença por ele causada, seu vetor e reservatórios, e sua evolução em animais de laboratório e em cultivo, gostaria de usar as próprias palavras de Carlos Chagas para enaltecê-lo: "Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em defesa da vida". E assim foi a bela descoberta de Carlos Chagas, cuja ciência fez arte em defesa da saúde do povo brasileiro e de toda a América Latina.

Arthur Neiva

Informações sobre a biologia do *Conorhinus megistus* Burm.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2(2): 206-212, 1910.

Arthur Neiva (1880-1943)

Cientista, entomologista e político baiano, desenvolveu importantes estudos sobre os barbeiros, descrevendo novas espécies e identificando o mecanismo de transmissão da doença de Chagas.

Informaçõis sobre a biolojia do Conorhinus megistus Burm. (*)

PELO

Dr. Arthur Neiva,
Assistente.

Beitraege zur Biologie des Conorhinus megistus Burm. (*)

VON

Dr. Arthur Neiva,
Assistenten am Institute.

O interesse que o *Conorrhinus megistus* oferece para a medicina data do descobrimento de Chagas que demonstrou ser elle o transmissor de uma tripanozomidiaze humana, produzida pelo *Schizotrypanum cruzi* Chagas. Este hemiptero é conhecido em algumas zonas do Brazil (Minas, São Paulo, Mato-Grosso), pelo nome vulgar de *barbeiro* e em outras (Mato-Grosso—Sul— e em algumas localidades de S. Paulo) pela dezignação de *chupança* ou mais raramente de *chupão*, nome pelo qual é conhecido em Goiaz; no Rio Grande do Sul, segundo nos afirmaram, é o *Conorhinus*

(*) Diagnoze de Burmeister:

« *Cimex megistus; fusco niger, pronoto antice spinis sex obtusis, postice lineolis quatuor, elytrorum venis, abdominisque segmentis margine sanguineis. Long. 17".*

Aus Brasilien; die grosse mir bekannte Art ganz schwarz, die Hinterleibsringe nur auf der Rueckenseite, besonders an den Seiten neben den Flügeldecken blutrot gerandet ».

Esta especie é colocada por Lethierry et Severin no genero *Lamus*. Vid. p. 115 T. III. 1896, do *Catalogue Général des Hemiptères-Hétéroptères*.

Cinjimo-nos, porem, á diagnoze dada por Amyot para o genero *Conorhinus* e aí colocamos a especie. (Vid. Amyot p. 383. Hemiptères. 1843).

Das Interesse, welches die Medizin dem *Conorhinus megistus* zuwendet, datiert von der Entdeckung von Chagas, dass er der Ueberträger einer menschlichen Trypanosomidiasis ist, welche durch das *Schizotrypanum cruzi* Chagas verursacht wird. Diese Wanze ist in einigen Teilen von Brasilien (Minas, S. Paulo, und Matto-Grosso) unter dem Namen *Barbeiro* (Barbier) bekannt, in anderen (Süden von Matto-Grosso und einigen Gegenden von São Paulo) als *chupança* oder seltener als *chupão*, welche letzterer Name auch in Goyaz gebräuchlich ist; in Rio Grande do Sul wird der Conorhinus, wie mir ver-

(*) Diagnose von Burmeister:

« Cimex megistus; fusconiger, pronoto antice spinis sex obtusis, postice lineolis quatuor, elytrorum venis, abdominisque segmentis margine sanguineis. Long. 17".

Aus Brasilien; die grosse, mir bekannte Art ganz schwarz, die Hinterleibsringe nur auf der Rückenseite, besonders an den Seiten neben den Flügeldecken blutrot gerandet ».

Lethierry und Severin stellen diese Art in das Genus Lamus. (V. T. III, 1896, pg. 115 des Catalogue Général des Hemiptères-Hétéroptères).

Ich folge jedoch der Diagnose von Amyot für das Genus *Conorhinus* und stelle die Species hierher. (V. Amyot, Hemiptères, 1843, pg. 383).

denominado vulgarmente *fincão* e em alguns estados do Norte *bicho de parede*.

A area de disseminação parece cobrir todo o paiz, possuindo o Instituto exemplares provindos dos confins da Guiana Ingleza, de Minas, S. Paulo, Mato-Grosso e Goiaz e tendo ainda informações, que lhe denunciam a prezença nos estados de Sergipe, Piauí e Pernambuco.

Atualmente é um inseto domiciliario, sendo provavel que este fato, constitua adaptação relativamente recente porquanto, quando se colocam exemplares em gaiolas contendo folhas verdes, se dezovam, o fazem aglutinando os ovos sobre as folhas, como é de regra, para os reprezentantes da familia. Devido aos novos habitos, que os obrigam a viver entre as frestas das cazas entaipadas, tal já não acontece, sendo as posturas feitas parceladamente e a granel.

Os *barbeiros* começam a sugar 3 a 5 dias depois de nacidos; as refeições fazem-se quazi sempre á noite e ás escuras, no entanto, podem alimentar-se durante o dia, como tivemos a oportunidade de observar em um *barbeiro* criado que sugava tranquilamente um cão que dormia, sem que fosse presentido; fato explicavel, por ser a picada quazi indolor, como experimentalmente verificámos sobre nós mesmo, alimentando larvas; além de que, as informações colhidas em cazas infestadas, depoem unanimes neste sentido. Apenas ás vezes, conseguem despertar o individuo sobre quem sugam, quando este ainda se não encontra em pleno sono, acontecendo surprender o inseto sobre o rosto, parte que parece ser a preferida pela hematofago.

As larvas e as ninfas conhecidas vulgarmente por *cascudos* atacam os leitos em contiguidade com as paredes; os adultos, porem, porque voam, agridem até aos que dormem em redes.

sichert wurde, gewöhnlich als *fincão* und in einigen nördlichen Staaten als *bicho de parede* (Mauer- oder Wandtier) bezeichnet.

Das Verbreitungsgebiet scheint das ganze Land zu umfassen, da das Institut einerseits Exemplare von der Grenze von Britisch Guyana, von Minas, S. Paulo, Matto-Grosso und Goyaz und andererseits Mitteilungen über dessen Vorkommen in den Staaten Sergipe, Piauhy und Pernambuco besitzt.

Gegenwärtig ist das Insekt ein Hausbewohner, doch stellt diese Lebensweise wohl eine relativ neue Anpassung dar, da Exemplare, welche man in Käfigen hält, welche grüne Blätter enthalten, bei der Ablage der Eier diese auf die Blätter kleben, wie es bei anderen Vertretern der Familie die Regel ist. Bei der neuerworbenen Gewohnheit in den Ritzen der Lehmhäuser zu leben, geschieht dies nicht, sondern die Eierablage findet in Parzellen oder *en bloc* statt.

Die Wanzen beginnen das Blutsaugen 3—5 Tage nach dem Verlassen der Eier; sie praktizieren es gewöhnlich in der Nacht und im Dunkeln, doch gelegentlich auch bei Tage, wie ich bei einem erwachsenen Exemplare beobachtete, welches bei Tage ruhig an einem schlafenden Hunde saugte, ohne von diesem bemerkt zu werden. Es erklärt sich dies aus der sehr geringen Schmerzhaftigkeit, welche ich auch experimentell feststellte, indem ich Larven an mir saugen liess; auch die in infizierten Häusern gemachten Erhebungen sprechen einstimmig dafür, dass die angefallenen Individuen nur zuweilen aufwachen, wenn der Schlaf nicht tief ist, wobei sie dann die Wanze auf ihrem Gesichte überraschen, da sie diese Region beim Blutsaugen bevorzugt.

Larven und Nymphen, gewöhnlich *cascudos* genannt (der Name beruht wohl auf Verwechslung mit Käfern, die ihrer harten Schalen wegen so genannt werden), invadieren die Betten, welche die Wände berühren, während die erwachsenen Wanzen, welche fliegen können, auch in Hängematten schlafende Menschen angreifen.

Em Itapura (S. Paulo) localidade imensamente infestada por 2 especies do *Conorhinus*, debalde procurámos fóra dos domicilios a prezença do *barbeiro*, aliaz assignalada pelos habitantes observadores em geral de pouca valia, porquanto, a maioria embora conhecendo o adulto do *barbeiro* supõe tratar-se de outro inseto muito diverso dos *cascudos*.

Das nossas investigações e indagações, verificámos tratar-se de outras especies e de genero diferente da de que ora nos ocupamos.

Os fatos que se vão seguir, foram observados no laboratorio, onde conseguimos criar de ovo á imajem *barbeiros* ali mentados durante o dia em cobaias.

Posturas: Fazem-se parceladamente constando de 1 a 45 ovos; geralmente a postura varia de 8 a 12 ovos, exercendo o hematofajismo incontestavel influencia, dando-se a postura 5 dias na media apoz cada refeição; este fato é melhor observado nas ♀♀ que ainda não copularam mas, que apezar disto, dezovam. As primeiras posturas, sejam ou não de ovos fecundos, são sempre as maiores, ocilando entre 15 a 25 ovos; as ultimas são reprezentadas por 2 — 4 ovos. Uma ♀ observada de 5 de Março a 31 de Julho, quando morreu, efetuou 38 posturas com um total de 218 ovos; releva notar que, este exemplar foi capturado adulto, sendo, portanto, provavel que já tivesse efetuado posturas.

Ovos de 1 — 10 dias são de côr branco-crême; de 12 a 20 dias adquirem colorido rozeo que se vai acentuando até ficar vermelho, ao cabo de 30 dias.

O dezalagamento muito depende da temperatura, dando-se de 25 a 30 dias nos mezes quentes e de 30 a 40 nos mezes frios.

In ITAPURA im Staate S. PAULO, einer von zwei *Conorhinusarten* sehr stark invadierten Gegend, suchte ich umsonst das angebliche Vorkommen derselben ausserhalb der Wohnungen zu konstatieren; die Einwohner, von denen die Angabe stammt, sind übrigens wenig zuverlässige Beobachter, da die meisten, trotz ihrer Bekannntschaft mit dem erwachsenen *Conorhinus*, denselben für ein anderes, von Larven und Nymphen ganz verschiedenes Insekt hielten. Bei meinen Nachforschungen konstatierte ich, dass es sich um verschiedene, zu anderen Gattungen gehörige, Arten handelte.

Nachstehende Beobachtungen wurden im Laboratorium gemacht, wo die Züchtung des *Conorhinus* vom Ei bis zur Imago gelang, indem man sie bei Tage an Meerschweinchen saugen liess.

EIABLAGE. — Die Eier werden in Parzellen von 1—45 Stück abgelegt; gewöhnlich sind es 8—12; doch übt die Blutaufnahme einen unzweifelhaften Einfluss auf die Ablage der Eier aus, welche im Mittel fünf Tage nach derselben stattfindet; diese Verhältnisse werden am besten an unbegatteten Weibchen beobachtet, welche auch so Eier legen. Die ersten Portionen, die gelegt werden, sind immer die grössten, gleichviel ob eine Befruchtung stattfand oder nicht, und schwanken zwischen 15 und 25 Eiern; die letzten bestehen aus 2—4 Eiern. Ein ♀, welches vom 5ten März bis zu seinem Tode am 31ten Juli beobachtet wurde, legte 38mal, im Ganzen 218 Eier; dabei muss bemerkt werden, dass es schon erwachsen gefangen wurde und wahrscheinlich schon früher gelegt hatte.

Die Eier sind in den ersten 10 Tagen rahmfarben; vom 12ten bis zum 20ten nehmen sie ein rosenfarbenes Kolorit an, das allmälig dunkler wird, so dass sie nach 20 Tagen rot erscheinen. Die Zeit des Ausschlüpfens hängt sehr von der Temperatur ab; in den warmen Monaten findet es nach 20—30, in den kalten nach 30—40 Tagen statt. Einer Temperatur von 0° ausgesetzt, entwickeln sich die Eier nur,

Os ovos quando submetidos a 0° só se evolvem colocados no refrijerador 1 a 2 dias depois da postura; á temperatura quotidiana de 37° não evolvem; alternando os dias no entanto, a evolução se apressa, podendo dezalagar-se em 20 dias.

Larvas: Ao nacer é a larva completamente rozea; 8 horas depois é de colorido pardo-escuro. Excecionalmente suga ao 3.° dia de nacida; comumente, a 1.ª refeição realiza-se do 5.° ao 8.° dia de nacimento durando 5; quando a larva procura espontaneamente a alimentação, fal-o espaçadamente de 15 a 20 dias de intervalo; este prazo é diminuido artificialmente. A 1.ª muda de pele faz-se aos 45 dias, a 2.ª de 2 a 3 mezes, a 3.ª de 4 a 6 mezes; sempre que se dá a ecdize readquire a larva o colorido rozeo que tinha ao nacer, depois da muda a larva não suga nos dias imediatos.

E' imprecindivel o hematofajismo para que se opere a muda, que se não observa nas larvas em jejum de mais de 70 dias, tempo mais que necessario para se terem já verificado 2 mudas. Com a 3.ª muda já se reconhece a que sexo pertencerá a imajem; as refeições já são mais demoradas, durando cerca de 10 a 12'; a alimentação mesmo voluntariamente é procurada quazi que semanalmente; tudo denota uma faze de grande vitalidade.

A 4.ª ecdize assinala o periodo ninfal o qual em condições muito favoraveis de alimentação e temperatura, pode ser atinjido no decurso de 190 dias no minimo; recomeçando o inseto a sugar 2 dias depois da muda. Neste estádio o *barbeiro* faz copiozas refeições de 15 a 20' de duração com mais ou menos 15 dias de intervalo; antes de picar, a ninfa segrega um liquido incolor de cheiro acre e de reação francamente alcalina; até a 3.ª muda esta secreção não é denunciada pelo

wenn die Abkühlung in den ersten zwei Tagen nach dem Legen stattfand; bei einer beständigen Temperatur von 37° entwickeln sie sich nicht, dagegen wird bei unterbrochener Einwirkung die Entwicklung beschleunigt und kann das Ausschlüpfen schon nach 20 Tagen erfolgen.

LARVEN. — Beim Ausschlüpfen ist die Larve rosenfarben, acht Stunden nachher ist ihr Kolorit dunkelbraun. Ausnahmsweise saugen sie schon am dritten Tage, gewöhnlich findet aber die Blutaufnahme erst am 5ten bis 8ten Tage statt und dauert 5. Obwohl die Larve, sich selbst überlassen, nur in Zwischenräumen von 15—20 Tagen Nahrung sucht, kann diese Frist künstlich verkürzt werden. Die erste Häutung erfolgt nach 45 Tagen, die zweite nach 2 bis 3, die dritte nach 4 bis 6 Monaten; bei jeder Ecdysis nimmt die Larve dasselbe rosenfarbene Kolorit an, wie beim Ausschlüpfen, auch saugt sie an den ersten Tagen nach dem Ausschlüpfen nicht.

Für die Häutung ist die Blutaufnahme eine notwendige Bedingung, da sie bei Larven die über 70 Tage fasten, nicht zu Stande kömmt, während eine solche Frist sonst mehr als hinreicht, um 2 Häutungen zu beobachten. Bei der dritten Häutung lässt sich schon erkennen, zu welchem Geschlechte die Imago gehören wird; die Blutaufnahme dauert schon länger, circa 10—12', die freiwillige Nahrungsaufnahme findet fast wöchentlich statt, was alles eine Phase grosser Vitalität kennzeichnet.

Die vierte Ecdysis eröffnet das Nymphenstadium, welches unter sehr günstigen Ernährungs- und Temperaturverhältnissen im Minimum von 90 Tagen erreicht werden kann, wobei das Insekt zwei Tage nach der Häutung wieder zu saugen anfängt. In diesem Stadium dauert die reichliche Nahrungsaufnahme 15 bis 20' mit Zwischenräumen von 15 Tagen; vor dem Stechen sondert die Nymphe ein farbloses Sekret von scharfem Geruche und deutlich alkalischer Reaktion

cheiro; a faze ninfal dura 42 dias no minimo e, é certamente, o periodo mais critico da vida do *barbeiro* sendo o da mortalidade maior; dias antes de se operar a ultima muda que é a 5.ª, a ninfa não procura mais alimentação, imobiliza-se até a transformação em imajem, que é então de um belo rozeo, levando cerca de 24 horas até adquirir o colorido definitivo o qual começa pelo ferrão, pernas, antenas, cabeça, abdome e finalmente o torax e as azas que aos poucos se vão dezenrugando permanecendo rozeas ainda por algum tempo; os unicos organs que não experimentam modificação são os olhos que permanecem sempre negros.

Um exemplar ♂ completou o ciclo de ovo a imajem em 260 dias; foi este o menor prazo observado. Depois de 8 dias de descanso os adultos podem começar a sugar; a principio refeições de 8 a 10′ com intervalos curtos, posteriormente, feitas num maior espaço de tempo de duração e de intervalo.

Uma ♀ conservada fóra do contato do ♂ pode dezovar 53 dias depois da 1.ª refeição.

Exemplares ♀♀ pouco tempo depois da transformação em imajens, aprezentam sensiveis diferenças quanto ás dimensões, comparadas com as dos exemplares que já dezovaram por varias vezes. A cópula é demorada e prolonga-se por muitas horas, nada podendo por enquanto informar qual o tempo que decorre entre esta e a 1.ª postura fecundada. Acreditamos que se realiza uma só cópula porque, já observámos 38 posturas todas de ovos fecundos provenientes de um exemplar capturado o qual, certamente, não dezovava pela 1.ª vez mas que, depois da captura, não esteve mais em contato com ♂♂.

Se adicionarmos aos 271 dias de ovo á imajem de um exemplar ♀ creado em

ab, während bis zur dritten Häutung dieses Sekret sich nicht durch den Geruch verrät. Das Nymphenstadium dauert im Durchschnitt wenigstens 42 Tage und ist zweifellos für den *Conorhinus* die am meisten kritische Periode, in welcher die Mortalität am grössten ist. Schon einige Tage bevor die fünfte und letzte Häutung stattfindet, sucht die Nymphe keine Nahrung mehr und verhält sich regungslos, bis zu ihrer Umwandlung in die Imago, welche dann eine schöne rosige Färbung zeigt; sie braucht ungefähr 24 Stunden um die definitive Färbung anzunehmen, welche am Stachel, den Beinen, Antennen, am Kopfe und am Abdomen beginnt, um endlich auf den Thorax und die Flügel überzugehen, welche sich nach und nach entfalten und noch einige Zeit rötlich bleiben. Die einzigen Organe, welche keine Veränderung erleiden, sind die Augen, welche immer schwarz bleiben.

Ein Männchen vollendete den Entwicklungscyclus vom Ei zur Imago im 260 Tagen, welche der kürzesten beobachteten Frist entsprechen.

Nach achttägiger Ruhe können die erwachsenen Wanzen mit dem Blutsaugen beginnen, zuerst acht bis zehn Minuten lang mit kurzen Zwischenräumen, später während längerer Zeit und mit grösseren Intervallen.

Ein Weibchen, welches mit keinem Männchen zusammenkam, konnte 53 Tage nach der ersten Blutaufnahme Eier legen.

Kurze Zeit nach der letzten Metamorphose zeigen die Weibchen in ihren Dimensionen bedeutende Unterschiede gegen solche, die schon mehrfach Eier gelegt haben.

Die Kopula ist von langer Dauer und kann sich über viele Stunden erstrecken, doch kann ich über die Zeit, die zwischen dieser und der ersten Ablage befruchteter Eier vergeht, keine bestimmt Angabe machen. Ich glaube, dass nur *eine* Begattung stattfindet, da ich beobachtete, dass ein gefangenes Weibchen, welches sicher schon gelegt hatte und nach dem Fange mit keinem Männchen in Berührung kam,

laboratorio, os 53 dias necessarios para a 1.ª postura, supondo que seja este tambem o prazo necessario para os exemplares que tenham copulado, teremos 324 dias para o ciclo completo de ovo a ovo do *Conorhinus megistus*.

E' bom insistir que é este, o prazo minimo possivel, porquanto, as condições artificiais de cultura auxiliaram imensamente a evolução.

Uma ♀ capturada quando já dezovava conservou-se viva em cativeiro mais de 150 dias de modo que, por este dado, podemos afiançar que, deduzindo o tempo de incubação do ovo, pode um *barbeiro* ser infetante pelo menos no espaço de 386 dias o que aliaz deve estar lonje do verdadeiro prazo de evolução, devido á circunstancia da facilidade de refeições na cultura artificial, muito apressar o ciclo evolutivo do *barbeiro*.

Os ♂♂ tambem sugam com muita facilidade, têm contudo, menos atividade que as ♀♀ e são tambem muito menos rezistentes ás intemperies, aos jejuns e, ainda em condições favoraveis, alimentam-se e vivem menos que ellas.

Larvas, ninfas e adultos alimentam-se com mais avidez em temperaturas altas, á temperatura de 14° diminue de muito, a vontade de se alimentar e não possuem a atividade que exercem no tempo quente.

Quanto á profilaxia, deve-se estabelecer como condição primordial para se impedir o dezenvolvimento dos *barbeiros*, o rebôco das cazas de taipa e das frestas e fendas, das paredes das habitações infestadas; o expurgo pelo emprego do gaz sulfurozo deverá ser de grande utilidade. E' sabido que as moradas recem construidas permanecem durante longo espaço de tempo indenes de invazão dos *barbeiros* que paulatinamente, começam a invadir as

noch 36mal Eier legte, welche alle befruchtet waren.

Wenn ich den 271 Tagen, welche ein im Laboratorium gezüchtetes Weibchen zur Entwicklung vom Ei bis zur Imago gebrauchte, die 53, bis zur ersten Eiablage nötigen, Tage zuzähle, unter der Annahme, dass diese Frist auch bei den begatteten Weibchen nötig ist, so erhalten wir für den ganzen Entwicklungscyclus des *Conorhinus megistus* von Ei zu Ei die Zeit von 324 Tagen. Es soll auch betont werden, dass dies die kürzeste notwendige Frist ist, da die künstlichen Bedingungen bei der Zucht die Entwicklung ungemein fördern.

Ein Weibchen, das, nachdem es schon gelegt hatte, gefangen wurde, lebte noch mehr wie 150 Tage in der Gefangenschaft, so dass ich, unter Abzug der Entwicklung im Ei, aus dieser Beobachtung schliessen muss, dass der *Conorhinus* während wenigstens 386 Tagen infektiös sein kann, was übrigens weit hinter der unter gewöhnlichen Verhältnissen gültigen Frist zurückbleiben muss, da die Leichtigkeit der Ernährung bei der Züchtung den Entwicklungscyclus des Schmarotzers ausserordentlich begünstigen muss.

Die Männchen saugen ebenfalls sehr gerne Blut, zeigen sich aber doch weniger aktiv, als die Weibchen, widerstehen auch Witterungsunbilden und Nahrungsmangel weniger und leben — auch unter günstigen Umständen und bei genügender Ernährung — weniger lange, als die Weibchen.

Larven, Nymphen und erwachsene Conorhinen saugen gieriger bei hoher Lufttemperatur; bei 14° nimmt ihr Blutdurst bedeutend ab und sie zeigen sich weniger aktiv, als in der heissen Zeit.

In prophylaktischer Hinsicht muss als erste Bedingung für die Behinderung der Entwicklung des *Conorhinus* das Tünchen der Lehmhäuser und das Ausfüllen von Ritzen und Spalter in infizierten Wohnungen gelten; die Bekämpfung mittelst Schwefeldampf sollte sich sehr nützlich erweisen. Es ist bekannt, dass frisch gebaute Häuser lange Zeit von der Invasion dieser Wanzen verschont bleiben,

habitações, transportados entre os arreios dos animais, como tivemos ocazião de observar em Mato-Grosso, onde os habitantes se utilizam para cavalgar de uma especie de albarda muito propicia a ocultação destes insetos; acreditamos que esta seja a principal maneira pela qual as habitações izoladas se infestam. Em povoados como os de Itapura onde existem arruamentos, os *barbeiros* podem invadir as rezidencias contiguas e os adultos são perfeitamente aptos a transpor pelo vôo toda a largura da rua.

Tivemos a oportunidade de observar, de uma feita, o abandono total pelos *barbeiros* de uma morada invadida por enxames de *formigas de correição* (Eciton) as quais produzem grandes devastações entre os insetos, obrigando-os a fujirem.

Quando a habitação é abandonada pelos moradores, um mez depois, já se não encontram vestijios dos *barbeiros* que se distribuem pelas cazas da vizinhança.

Havendo certa condição de humidade podem os barbeiros suportar prolongados jejuns. Já possuimos um exemplar ♀ que nos foi enviado de zona limitrofe da Guiana Ingleza, encerrado em pequena caixinha e que chegou ainda vivo ao laboratorio 57 dias apoz a captura.

Raras vezes podem as ninfas ou os adultos fazer refeições posto que pequenas, em dias seguidos, nunca indo além de 3 dias.

Em geral, de cada postura, todos ovos dezalagam.

A ecdize dá-se vagarozamente, levando uma larva 3 horas nesta operação e a ultima muda o dobro pelo menos.

Com as ninfas acontece passarem ás vezes, 30 e mais dias sem que procurem alimentar-se.

Manguinhos, Maio—1910.

welche sich nur nach und nach in denselben einfinden, besonders durch Vermittlung des Sattelzeuges, wie ich in Matto-Grosso zu beobachten Gelegenheit hatte, wo die Bewohner beim Reiten eine Art von Sattel benutzen, welche für Verstecke dieser Insekten sehr günstige Bedingungen bietet; ich halte dies bei isolierten Häusern für den hauptsächlichsten Infektionsmodus. In Ansiedelugen, wo, wie in ITAPURA, Häuserreihen existieren, können die Wanzen die Nachbarhäuser befallen und die erwachsenen *Conorhinen* können auch ganz wohl die Breite einer Strasse überfliegen.

Ich hatte Gelegenheit das plötzliche und vollständige Verlassenwerden einer von Conorhinen infizierten Wohnung zu beobachten; es geschah dies durch das Eindringen von Scharen von Wanderameisen (Eciton), welche unter den Insekten grosse Verwüstungen machen und sie zur Flucht zwingen.

Wenn eine Wohnung von den Insassen verlassen wird, so finden sich schon nach einem Monate keine Spur von Conorhinen mehr, indem sich letztere auf die Nachbarhäuser verteilen.

Bei genügender Feuchtigkeit kann der Conorhinus ein langes Fasten ertragen. So besass ich ein Weibchen, welches uns von der Grenzzone von British Guyana in einer kleinen Schachtel eingeschlossen übersandt wurde und 57 Tage nach dem Einfangen noch lebend in meine Hände kam.

Selten können Nymphen und erwachsene Conorhinen zwei Tage hintereinander Blut saugen, selbst wenn es sich um geringe Mengen handelt, und niemals mehr als drei Tage hintereinander.

Gewöhnlich schlüpfen sämmtliche Eier eines Geleges aus.

Die Ecdysis geht langsam vor sich, indem eine Larve für diesen Vorgang drei Stunden und ein erwachsener Conorhinus wenigstens das Doppelte gebraucht.

Die Nymphen können manchmal 30 und mehr Tage zubringen, ohne Nahrung zu suchen.

Manguinhos, Mai—1910.

Comentários

Contribuição do Artigo de Arthur Neiva (1910) para a Biologia dos Hemiptera, Subfamília Triatominae, Família Reduviidae

Eloi de Souza Garcia
Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

No histórico artigo publicado em 1910 nas *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, o primeiro a descrever com detalhes a biologia de um Triatominae, Arthur Neiva analisa de maneira original a complexidade do ciclo de vida do inseto hematófago *Conorrhinus megistus* (denominado posteriormente de *Panstrongylus megistus*), por ser um dos vetores de uma tripanossomíase humana descoberta por Carlos Chagas em 1909, doença causada pelo *Schizotrypanum cruzi* (renomeado mais tarde como *Trypanosoma cruzi*).

OS DADOS DE ARTHUR NEIVA

Além de descrever sua distribuição geográfica nos estados brasileiros e nome vulgar (barbeiro, chupança, chupão, fincão ou bicho de parede), seu caráter domiciliário e hábitos de viver entre as frestas das paredes das casas pobres existentes, Neiva fez observações refinadas sobre a alimentação desses animais. Ele observou, por exemplo, que começavam a sugar de três a cinco dias após a eclosão dos ovos, que tal alimentação ocorria preferencialmente à noite e que o animal sugado não se sentia incomodado com isso, ou seja, a picada e a sucção do sangue pelo inseto eram indolores. Aliás, utilizando seu próprio braço para alimentar os barbeiros, ele verificou a ausência de dor quando ninfas do *P. megistus* sugavam seu sangue.

Estudando em seu laboratório esses insetos e utilizando cobaias como fonte de alimento, Neiva demonstrou que a primeira postura de cada inseto variava de 15 a 25 ovos, que a hematofagia era fundamental para essa oviposição, e que a eclosão dos ovos variava conforme a temperatura. Suas observações sobre o desenvolvimento das ninfas são fantásticas, descrevendo detalhes como a cor rósea do inseto ao sair do ovo e seu escurecimento algumas horas depois, bem como o período em que se alimentam e em que desenvolvem as ecdises em cada estádio ninfal. O autor correlacionou de maneira precisa as mudas com o repasto sangüíneo, o tempo da alimentação em cada fase do desenvolvimento do inseto e as condições

de umidade relativa em sua sobrevida. Chamou a atenção para o demorado tempo da cópula e observou que bastava uma fecundação para a fêmea depositar ovos férteis por pelo menos 38 posturas sem a presença do macho. No final de seu artigo, alertou sobre as más condições de saúde e de vida da população rural, para a melhoria das casas como condição primordial para impedir o desenvolvimento do barbeiro e para a grande utilidade do gás sulfuroso no controle desses insetos.

Todos esses dados biológicos observados por Neiva foram fonte de inspiração para outros autores desenvolverem seus trabalhos e explicarem fenômenos fisiológicos desde os longínquos anos 1930 até no início deste século.

Farei, a seguir, alguns comentários referentes a essas novas descobertas.

AS INTERPRETAÇÕES ATUAIS

A distribuição dos vetores

Hoje está bem conhecida a distribuição de insetos vetores da doença de Chagas desde o sul dos Estados Unidos, onde foram reportados apenas poucos casos, até a província de Chubut, na Argentina. Disso decorre a designação de tripanossomíase americana para a entidade mórbida descrita por Carlos Chagas (1909). São mais de 130 espécies de triatomíneos vetores e possíveis vetores de *T. cruzi*, participando na manutenção da enzootia chagásica. Estima-se que sejam de 16 a 18 milhões de indivíduos infectados e de aproximadamente oitenta milhões a população em risco de contaminação na América Latina (Schmunis, 1997; WHO, 1991). Os triatomíneos ainda encontram nas habitações rurais de péssima qualidade condições ideais de abrigo e facilidade de alimento, tornando a transmissão vetorial um mecanismo primário de difusão da doença (Dias, 1999). Coura, Barret e Arboleda-Naranjo (1994) descreveram no Amazonas uma possível maneira diferente da transmissão vetorial da doença de Chagas: ataque de populações humanas por insetos silvestres.

A sucção do sangue sem dor

Quanto ao mecanismo da picada sem dor descrito por Neiva, hoje se sabe que a saliva dos triatomíneos contém uma série de substâncias que auxiliam na tarefa da alimentação, pois inibem os danos mecânicos decorrentes da atuação das peças bucais sobre a pele do hospedeiro durante o repasto sangüíneo. Por outro lado, tais substâncias também provocam uma série de respostas fisiológicas, como a liberação de componentes hemostáticos que evitam a perda do sangue do hospedeiro, por meio dos mecanismos de agregação plaquetária, coagulação do sangue e/ou vasoconstrição, assim como de inflamação pela liberação da prostaglandinas, histamina e/ou serotonina. Estas substâncias, por sua vez, alertam o hospedeiro sobre a presença de um estímulo doloroso, facilitando sua eliminação, e a resposta imunológica relacionada ao local da picada, como liberação de interleucinas, histamina, ativando a resposta de mastócitos e macrófagos e a resposta humoral (Ribeiro & Francischetti, 2003). A importância da saliva na alimentação de triatomíneos foi registrada por Ribeiro e Garcia (1981). Os triatomíneos, ao se alimentarem, inoculam nos hospedeiros a saliva, que contém grande variedade de atividades biológicas, incluindo anticoagulantes, vasodilatadores, molécula responsável por atividade anestésica, molécula formadora de poro, agente inibidor do complemento, inibidores de agregação plaquetária induzida por colágeno, ADP, ácido araquidônico, trombina, serotonina, epinefrina e norepinefrina (para revisão, ver Ribeiro & Franscischetti, 2003).

O desenvolvimento do inseto

Quanto à explicação das observações de Neiva relacionadas ao desenvolvimento do inseto, muito do conhecimento hoje existente deve-se aos trabalhos de Wigglesworth (para revisão, ver o livro de Wigglesworth, 1972), que, utilizando experimentos de parabiose e de implantação de glândulas e transplantes de cabeça em *Rhodnius prolixus*, revelou a importância das células neurossecretoras encontradas na região "intercerebralis" para a secreção de hormônio protorácicotrópico (PTTH), do *corpus allatum* para a produção de hormônio juvenil (JH), além do papel desse hormônio na manutenção dos estádios ninfais, bem como das glândulas protorácicas, que, estimuladas pelo PTTH, induzem a produção de ecdisona (hormônio da muda). A presença desses hormônios causa o desenvolvimento subseqüente das ninfas até chegar à imago. Por sua vez, a produção de PTTH é estimulada pela distensão abdominal causada pelo farto repasto sangüíneo.

A reprodução do inseto

Na fase adulta, correlacionados com a alimentação sangüínea, os ovários amadurecem, desenvolvem os ovócitos e inicia-se a postura de ovos. A importância do JH nesse processo foi demonstrada por Davey (1980), que comprovou que fêmeas allatectomizadas de *R. prolixus* não desenvolviam os ovários e que o JH aplicado nesses insetos restabelecia a ovogênese. Esse autor também demonstrou que fêmeas fecundadas colocam mais ovos e que nelas a postura se inicia mais cedo do que nos insetos virgens. Davey mostrou que fêmeas acasaladas produzem um fator miotrópico no cérebro, cuja ausência leva à retenção de ovos nos ovários e à produção de uma antigonadotrofina, que é antagonista ao efeito do JH sobre as células ovarianas. Esses dados explicam o comportamento da reprodução descrito por Neiva.

A organização intestinal

Recentemente, registrou-se que a ecdisona é também fundamental para o desenvolvimento do *T. cruzi* no intestino dos vetores. Garcia e colaboradores (2007) demonstraram que em insetos que não produzem ecdisona ocorrem desorganizações estruturais das membranas perimicrovilares das células epiteliais intestinais, o que inibe a aderência dos parasitas, fenômeno crucial na complementação do ciclo do *T. cruzi* no vetor. Essa alteração fisiológica se processa por meio do hormônio protorácicotrópico secretado pelo cérebro, o qual interfere na produção de ecdisona.

REFERÊNCIAS

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi, n. gen., n. sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

COURA, J. R.; BARRET, T. V. & ARBOLEDA-NARANJO, M. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27: 251-253, 1994.

DAVEY, K. G. The physiology of reproduction in *Rodhnius* and other insects: some question. *In*: LOCKE, M. & SMITH, D. S. (Eds.). *Insect Biology in the Future: VBW'80*. New York: Academic Press, 1980.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. *In*: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. & BARRAL-NETO, M. (Orgs.). Trypanosoma cruzi *e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GARCIA, E. S. *et al.* Exploring the role of insect factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi : Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology*, 53: 11-21, 2007.

NEIVA, A. Informações sobre a biologia do *Conorhinus megistus* Burm. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2: 206-212, 1910.

RIBEIRO, J. M. & FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology*, 48: 73-88, 2003.

RIBEIRO, J. M. & GARCIA, E. S. The role of salivary glands in feeding in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Experimental Biology*, 94: 219-230, 1981.

SCHMUNIS, G. A. Tripanossomíase americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. *In*: DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. (Eds.). *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: um manual prático para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Control of Chagas Disease*. Geneva: WHO, 1991. (WHO Technical Report Series, 811)

WIGGLESWORTH, V. B. *The Principles of Insect Physiology*. 7. ed. London: Chapman & Hall, 1972.

O Legado de Arthur Neiva ao Desenvolvimento da Triatominologia do Instituto Oswaldo Cruz no Centenário da Descoberta da Doença de Chagas: 'Informaçõis sobre a biolojia do *Conorhinus megistus* Burm'

José Jurberg
Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

O Instituto Oswaldo Cruz (IOC), e principalmente os entomólogos, comemoram neste início do século XXI o centenário da descoberta, feita nesta instituição, de uma tripanossomíase que nos primórdios era taxada como do Novo Mundo e mais tarde, em homenagem ao seu descobridor Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, passou a ser denominada doença de Chagas. Preito mais que louvável, pois foi ele quem desvendou os quatro pontos cardeais da doença, de maneira inversa: o vetor vulgarmente conhecido como "barbeiro", os reservatórios silvestres e domésticos, o agente etiológico – uma nova espécie de tripanossoma a que denominou de *cruzi*, em honra a um de seus mestres, Oswaldo Cruz – e o agente sensível – o homem (Chagas Filho, 1993; Fonseca Filho, 1974; Milles, 1996).

A descoberta da doença em Lassance, Minas Gerais, causou perplexidade entre os acadêmicos, pois muitos alegavam que os sintomas detectados concerniam a outras doenças que acometiam a população miserável, que vivia em casebres no interior do país. Anos mais tarde a doença foi diagnosticada na Argentina por Salvador Mazza, o que causou grande impacto por ter confirmado a veracidade da descoberta de Carlos Chagas, motivo pelo qual este teve seu nome cogitado para receber o Prêmio Nobel de Medicina (Dias & Herman, 2004). Ao descobrir em 1907 a importância daquele percevejo que sugava sangue da face dos moradores nas cafuas, Chagas incumbiu Arthur Neiva de nominá-la, e este a identificou

como *Conorhinus megistus* Burmeister, 1835, fato que lançou as bases do que viria a ser a Escola Triatomínica em Manguinhos. Por esse motivo estamos comemorando também o centenário da criação do Laboratório de Triatomíneos, hoje Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (Jurberg, 1999; Lent, 1999). Neste centenário de atividades ininterruptas, a semente plantada por Chagas e Neiva em 1909 e 1910 desenvolveu-se, com César Pinto (1925-1946), Herman Lent (1935-2004) e José Jurberg (1960), naquele que é um dos laboratórios mais antigos do IOC (Lent, 1972, 1999).

A credibilidade para identificação de triatomíneos credenciou este laboratório para receber amostras de todas as partes do mundo. Temos uma coleção de referência com tipos e representantes da maioria das espécies conhecidas, a qual está dividida em duas partes: a Coleção Herman Lent, aberta, que recebe material para incorporação, e a Coleção Rodolfo Carcavallo, fechada, com 15.000 exemplares. O laboratório possui o maior insetário de triatomíneos existente no mundo, com 45 espécies em manutenção; a criação de barbeiros propicia condições para nossos trabalhos de pesquisa pura e aplicada, além de oferecer a outros pesquisadores o acesso a material validado (Jurberg, 1999; Jurberg & Galvão, 2006).

Ao se analisar o primeiro artigo escrito por Neiva sobre a biologia do *Conorhinus megistus*, não se pode perder de vista o contexto de sua obra, pois sua rica biografia mostra um homem de múltiplas facetas – cientista, sanitarista, político, intelectual e, sobretudo, um construtor de instituições, pelo prestígio conquistado por sua inteligência e pelo trabalho que desenvolveu (Rebouças & Bacilieri, 2005).

Neiva teve a primazia de implantar os estudos pioneiros sobre a biologia e taxonomia de triatomíneos, que não eram a sua especialidade. De 1910 a 1939 publicou 18 artigos científicos, inclusive sua tese intitulada *Revisão do Gênero* Triatoma em 1914, para a Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, apesar de ter iniciado seus estudos na Bahia. Iniciou sua vida profissional em 1903, ainda como estudante de medicina, trabalhando na campanha de erradicação do mosquito transmissor da febre amarela, promovida por Oswaldo Cruz. Em 1906 ingressou em Manguinhos e direcionou suas atividades para a entomologia, publicando artigos sobre triatomíneos em que esclareceu importantes aspectos do seu comportamento, de sua biologia e da sistemática, pois até então o grupo era conhecido pelo hematofagismo dos adultos em mamíferos. Implantou um insetário, em que registrava o desenvolvimento de ovo a adulto, tendo publicado seu primeiro artigo em 1910, com registros sobre: a influência de temperatura, umidade e hematofagismo obrigatório na fase ninfal; a picada indolor; a infecção dos barbeiros; a transmissão, que acreditava se dar por meio da picada, como acontecia com os mosquitos, nos quais era um grande especialista (Neiva, 1910, 1913).

Sua segunda grande contribuição foi em relação à sistemática, pois, tendo percebido a importância da nova descoberta, procurou visitar os principais museus onde estavam depositados os tipos e analisá-los, para desenvolver as bases morfológicas e cromáticas, ampliando o conhecimento do grupo. No princípio assinou somente cerca de dez artigos; mais tarde, a partir de 1922, publicou mais cinco artigos com César Pinto, também considerado cientista da primeira geração de triatominólogos do IOC. Em 1936, uma nova parceria se estabeleceu entre Arthur Neiva, César Pinto e um novo discípulo, Herman Lent, e teve início a segunda geração. Herman Lent trabalhou no laboratório por 35 anos até 1970, quando foi aposentado compulsoriamente por força do ato institucional nº 5 do governo militar instaurado em 1964, e proibido de freqüentar o instituto e sua biblioteca (Lent & Wygodzinsky, 1979; Lent, 1999; Jurberg, 1999).

Grande parte do prestígio de que Arthur Neiva desfrutava como pesquisador decorria do fato de que, como entomólogo, ele foi um dos responsáveis, juntamente com Ângelo Moreira da Costa Lima, por implantar métodos de controle contra a broca do café, um coleóptero que destruía o principal produto de exportação na época; para tanto, valeu-se do controle biológico, introduzindo no país um micro-himenóptero importado da África, parasito natural da broca.

Em seu artigo sobre a biologia do então *Conorhinus* (hoje nominado *Panstrongylus*), Neiva já destacava aspectos da sua bionomia, estabelecendo parâmetros que viriam a se tornar obrigatórios para a fixação das espécies. Nesse texto, abordou: a obrigatoriedade do hematofagismo na fase ninfal; a duração do ciclo biológico de ovo a adulto, com cada estádio registrado; a duração do tempo de alimentação; a quantidade de ovos por posturas e o total; o tempo para o desalagamento; a domiciliação recente; a voracidade provocada pelo jejum induzindo a procura de sangue à luz do dia; a facilidade com que os indivíduos se expunham quando suas camas estavam próximas às paredes gretadas; a influência do clima, pois as altas temperaturas induziam as ninfas a maior número de repastos sangüíneos; a forma de interromper a infestação das casas por meio de expurgos com gás sulfuroso, inseticida da época; as infestações seguintes, quando eram levados para dentro das casas os arreios e apetrechos dos viajantes, que poderiam albergar barbeiros; os curtos limites de vôo de um foco a outro; o papel da umidade relativa do ar na manutenção dos barbeiros mesmo em jejum; os princípios da construção de casas cujas paredes tivessem reboco, além de aspectos do controle biológico natural, como quando observou que "o abandono total pelos barbeiros de uma morada invadida por enxames de formigas correição produzindo devastações entre os insetos obrigando-os a fugirem".

Cada um desses itens do artigo de Neiva deu ensejo a muitos artigos sobre as espécies conhecidas, ampliando o conceito específico. Dentre esses artigos, podemos destacar a revisão de Lent e Wygodzinsky (1979) e os trabalhos de Carcavallo e colaboradores (1998a, 1998b, 1998-1999); Ryckman e Blakenship (1984); Ryckman e Zackrison (1987) com mais de 24.000 citações para as Américas; Silva e colaboradores (1985, 1999), que publicaram extensa obra sobre a influência da temperatura na biologia dos triatomíneos; Jurberg e Galvão (2006), sobre os triatomíneos em geral; Canale e colaboradores, 1999; Jurberg e Costa (1989); Jurberg e Rangel (1980); Jurberg, Reis e Lent (1970); Lent e Jurberg (1969), Prata (1981, 1999); Prata e Santana (1983), Rocha e colaboradores (1997), Salvatella e colaboradores (1999) e Schofield (1994).

À medida que os resultados sobre etologia, biologia e taxonomia eram divulgados, abriram-se novos campos para ampliar o conhecimento sobre: cada espécie e sua importância na disseminação da doença; métodos para o controle do vetor; utilização correta dos novos inseticidas considerados os parâmetros biológicos de cada espécie; uso de técnicas de precipitinas para descobrir as fontes alimentares naturais; morfometria; microscopia eletrônica de varredura; análises morfológicas comparativas das estruturas fálicas (Lorosa *et al.*, 1999, 2000).

No século XXI, a doença de Chagas continua sendo um grande flagelo para as populações rurais, em que o barbeiro continua responsável por mais de 80% da transmissão, com milhões de indivíduos infectados e outros milhões vivendo nas áreas endêmicas, apesar dos progressos obtidos nas campanhas de controle dos vetores, principalmente do *Triatoma infestans* na América do Sul.

Nosso desafio é imenso. O aquecimento global favorece a expansão da distribuição geográfica dos vetores que vivem na região tropical, as espécies secundárias estão ocupando o

nicho deixado pelos principais transmissores e estão sendo descobertos novos táxons, motivo pelo qual precisamos formar taxonomistas e pessoal qualificado para o controle de vetores.

A melhoria das habitações, a implantação de medidas de saúde, educação, saneamento, o controle dos vetores domiciliados e a vigilância contínua deverão ser práticas observadas para conter a doença no continente sul-americano.

Arthur Neiva faleceu na cidade do Rio de Janeiro em 1943 e teve seu nome imortalizado na triatominologia quando Herman Lent descreveu *Rhodnius neivai* em 1953, inseto encontrado na Colômbia e na Venezuela.

REFERÊNCIAS

CANALE, D. M. *et al.* Bionomia de algumas espécies. *In*: CARCAVALLO, R. U. *et al.* (Eds.). *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1999. v. 3.

CARCAVALLO, R. J. *et al.* Fontes e padrões alimentares. *In*: CARCAVALLO, R. U. *et al.* (Eds.). *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998a. v. 2.

CARCAVALLO, R. J. *et al.* Habitats e fauna relacionada. *In*: CARCAVALLO, R. U. *et al.* (Eds.). *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998b. v. 2.

CARCAVALLO, R. J. *et al.* (Eds.). *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas*, *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998-1999. v. 3.

CHAGAS FILHO, C. *Meu Pai*. Rio de Janeiro: Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz, 1993.

DIAS, J. C. P. & HERMAN, L. Ciência, vida e exemplo. *Entomología y Vectores*, 11: 1-18, 2004.

FONSECA FILHO, O. *A Escola de Manguinhos: contribuição para o estudo do desenvolvimento da medicina experimental no Brasil*. São Paulo: Revista dos Tribunais, 1974.

JURBERG, J. Noventa anos da descoberta da doença de Chagas e a criação do Centro de Referência em Taxonomia de Triatomíneos. *Entomologia y Vectores*, 6: 315-322, 1999.

JURBERG, J. & COSTA, J. M. Estudos sobre a resistência ao jejum e aspectos nutricionais de *Triatoma lecticularia* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84: 393-399, 1989.

JURBERG, J. & GALVÃO, C. Biology, ecology and systematics oft Triatominae (Heteroptera-Reduviidae) vectors of Chagas' disease and implications for human health. *Denisia*, 19: 1.096-1.116, 2006.

JURBERG, J. & RANGEL, E. F. Observações sobre *Rhodnius robustus* Larousse, 1927 e *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Brasileira de Biologia*, 40: 569-577, 1980.

JURBERG, J.; REIS, V. R. G. & LENT, H. Observações sobre o ciclo evolutivo em laboratório de *Rhodnius robustus* Larousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Brasileira de Biologia*, 30: 477-481, 1970.

LENT, H. Desenvolvimento da entomologia no Instituto Oswaldo Cruz. *Ciência e Cultura*, 24: 1.192-1.200, 1972.

LENT, H. A evolução dos conhecimentos sobre os vetores da doença de Chagas 90 anos após a sua descoberta. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, supl. 1: 89-92, 1999.

LENT, H. & JURBERG, J. Observações sobre o ciclo evolutivo em laboratório de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 41: 125-131, 1969.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 163: 123-520, 1979.

LOROSA, E. S. *et al.* Estudo das fontes alimentares de *Triatoma sordida* (Stal, 1859) do estado do Mato Grosso do Sul, através da comparação das técnicas de precipitina e imunodifusão dupla. *Entomologia y Vectores*, 6: 156-165, 1999.

LOROSA, E. S. *et al.* Hemolinfa de Dictioptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores*, 7: 287-296, 2000.

MILLES, M. A. New world tripanosomiasis. *In*: COX, F. E. G. (Ed.). *Illustrated History of Tropical Disease*. London: The Wellcome Trust, 1996.

NEIVA, A. Informações sobre a biologia do *Conorhinus megistus* Burm. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2: 206-212, 1910.

NEIVA, A. Informações sobre a biologia da vinchuca, *Triatoma infestans* Klug. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 5: 24-31, 1913.

PRATA, A. *Carlos Chagas: coletânea de trabalhos científicos*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1981.

PRATA, A. *Bibliografia Brasileira sobre Doença de Chagas*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1999. v. 1 e 2.

PRATA, A. & SANT'ANNA. *Bibliografia Brasileira sobre Doença de Chagas, 1909-1979*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1983.

REBOUÇAS, M. M. & BACILIERI, S. Arthur Neiva: o ideal acima de tudo. *Páginas do Instituto Biológico*, 1(2): 1-4, jul.-dez. 2005.

ROCHA, D. S. *et al.* Desenvolvimento de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 alimentados através de membrana de silicone e em camundongos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 553-558, 1997.

RYCKMAN, R. E. & BLANKENSHIP, C. M. The parasites, predators and symbionts of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Bulletin of the Society of Vector Ecologists* 9: 84-111, 1984.

RYCKMAN, R. E. & ZACKRISON, J. L. A Bibliography to Chagas' disease, the Triatominae and Triatominae-borne Trypanosomes of South America (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Bulletin of the Society of Vector Ecologists* 12: 1-464, 1987.

SALVATELLA, R. *et al.* Ambiente humano: habitações e locais peridomiciliares. *In*: CARCAVALLO, R. U. *et al.* (Eds.). *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1999. v. 2.

SCHOFILED, C. J. *Triatominae, Biologia y Control*. W. Sussex: Eurocommunica Publications, 1994.

SILVA, I. G. *et al.* Influência da temperatura na biologia dos Triatomíneos. I - *Triatoma rubrovraria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae). *Revista Goiana de Medicina*, 31: 1-37, 1985.

SILVA, I. G. *et al.* 23 citações bibliográficas sobre a influência da temperatura na biologia dos triatomíneos abrangendo de 1985 a 1994: bionomia de algumas espécies. *In*: CARCAVALLO, R. U. *et al.* (Eds.). *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1999. v. 3.

Gaspar Vianna

Contribuição para o estudo da anatomia
patológica da 'moléstia de Carlos Chagas'
(esquizotripanose humana de tireoidite parasitária).
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 3: 276-293, 1911.

Gaspar Vianna (1885-1914)

Médico paraense do Instituto de Manguinhos, desenvolveu importantes estudos histopatológicos sobre a doença de Chagas, dos quais destaca-se a descoberta de que o *Trypanosoma cruzi* multiplica-se no interior dos tecidos e não no sangue, como observado em outros tripanossomos.

Contribuição para o estudo da anatomia patolojica da "Molestia de Carlos Chagas"

(Esquizotripanoze humana ou tireoidite parazitaria)

PELO

Dr. Gaspar Vianna.

Beitrag zum Studium der Pathologischen Anatomie der Krankheit von Carlos Chagas

(Schizotrypanose des Menschen oder parasitaere Thyreoiditis)

VON

Dr. Gaspar Vianna.

A convite do Dr. CARLOS CHAGAS, encetámos o estudo das alterações histolojicas na esquizotripanoze pela pesquiza no sistema nervozo. Infetámos varios gatos e o material nos pareceu desde logo magnifico para o estudo das lezões do sistema nervozo, porque os exemplares inoculados aprezentaram fenomenos curiozos de perturbações motoras, principalmente notaveis nos membros, sendo os posteriores por mais vezes e com mais intensidade acometidos.

Aos primeiros passos no assunto, tivemos de suspender o trabalho para acudir ao estudo do material d'uma autopsia, em individuo morto pela molestia. Realizada no cadaver d'uma criança de 3 mezes, com o diagnostico de esquizotripanoze de forma aguda, feito em vida pelo proprio Dr. CHAGAS, atinjiam as peças colhidas um grande valor.

Auf Ansuchen von Dr. CARLOS CHAGAS begann ich das Studium der histologischen Veränderungen bei der Schizotrypanose mit der Untersuchung des Nervensystems. Ich infizierte verschiedene Katzen und das Material schien mir von vorn herein für das Studium der Läsionen des Nervensystems äusserst günstig, weil die geimpften Tiere merkwürdige Erscheinungen motorischer Störungen boten, welche besonders an den Extremitäten bemerkbar waren, wobei die hinteren häufiger und intensiver befallen wurden.

Nach kaum begonnenen Studien musste ich diese Arbeit unterbrechen, um mich der Untersuchung des Sektionsmateriales zuzuwenden, welches von einem an der Krankheit Verstorbenen herrührte. Da es sich um ein dreimonatliches Kind handelte, bei welchem während des Lebens von Dr. CARLOS CHAGAS die Diagnose einer akuten Form der Schizotrypanose gestellt worden war, kam dem gewonnenen Material eine besondere Bedeutung zu.

Efetivamente revelaram os córtes lezões curiozissimas que apenas esquematicamente podem ser referidas no momento atual.

Apoz esta, novas necropsias fez o Dr. CHAGAS, de modo que até hoje atinjem a 10 o numero de cazos de que temos as viceras para estudo histopatolojico.

Segundo informações do Dr. CHAGAS sobre as lezões macroscopicas encontradas nas autopsias realizadas, parece possivel julgar por ellas, com baze firme, se o cadaver pertence a um esquizotripanozico. Apezar da «molestia de CARLOS CHAGAS» aprezentar varias modalidades clinicas, existe, na faze letal, quer se trate de cazo agudo, quer de cazo cronico, um conjunto de lezões capaz de por si só, deixar prezumir a especificidade das modificações morbidas. O quadro patolojico varia de intensidade de uma a outra forma, mas não se modifica qualitativamente.

Aos sinais constantes observados sempre por CHAGAS, outros se juntam conforme a séde da principal lezão observada em vida.

Assim num cadaver da forma cardiaca é intuitivo que o coração seja o ponto de lezões intensas e carateristicas.

Nas formas nas quais ha lezões cronicas do sistema nervozo, a meninjite ou melhor, a encefalo-meninjite, associa o seu quadro de lezões particulares aos sinais gerais e constantes.

Das palavras, pronunciadas pelo Dr. CHAGAS na sua conferencia na Academia Nacional de Medicina e de apontamentos, que nos ministrou pessoalmente, deduzimos este quadro geral para as necropsias da molestia: « Poliorominite generalizada. O liquido existente nas serozas é citrino. Existencia constante de numerozos gan-

In der Tat ergaben die Schnitte äusserst merkwürdige Veränderungen, über welche ich gegenwärtig nur in schematischer Weise berichten kann.

Nach dieser machte Dr. CHAGAS noch weitere Sektionen, so dass heute die Zahl der Fälle, von denen innere Organe für die histologische Untersuchung vorliegen, bereits zehn beträgt.

Nach den Mitteilungen von Dr. CHAGAS über die makroskopischen Veränderungen, welche bei den ausgeführten Sektionen beobachtet wurden, erscheint es möglich, nach denselben mit Sicherheit zu beurteilen, ob eine Schizotrypanuminfektion vorliegt. Obgleich die Krankheit von CARLOS CHAGAS verschiedene klinische Formen zeigt, so besteht doch, wenn sie zum Tode führt, sowohl bei akuten, wie bei chronischen Fällen, ein Symptomenkomplex, der für sich allein gestattet, die Spezifizität der krankhaften Veränderungen vorauszusetzen. Das pathologische Bild der verschiedenen Formen zeigt eine ungleiche Intensität, ohne sich qualitativ zu ändern.

Zu den von CHAGAS beständig beobachteten Anzeichen kommen, entsprechend dem hauptsächlichen Sitze der während des Lebens beobachteten Krankheitserscheinungen, andere hinzu.

Demgemäss wird, falls im Leben die Herzsymptome vorgeherrscht haben, in der Leiche das Herz besonders intensive und charakteristische Erscheinungen darbieten.

Bei den Formen, die längere Zeit nervöse Störungen zeigten, fügt die Meningitis oder richtiger Encephalomeningitis die die ihr eigentümlischen Veränderungen zu den allgemeinen und charakteristischen Erscheinungen hinzu.

Aus den Mitteilungen, welche Dr. CHAGAS bei Gelegenheit seines Vortrages in der *Academia Nacional de Medicina* machte und aus den Notizen, die er mir persönlich gab, konstruiere ich für die Sektionen bei dieser Krankheit das folgende Bild:

Allgemeine Polyorrhomenitis mit serösem Ergusse von gelber Farbe. — Kon-

glios aumentados de volume na cavidade abdominal, mediastino, pescoço, axilas e virilhas. Dejeneração gorduroza do figado mais ou menos acentuada conforme a morbidez do cazo, sendo nas formas agudas comparavel á dejeneração identica observada na febre amarela. Baço lijeiramente aumentado de volume e, por vezes, friavel. Existencia *infalivel* de lezões tireoidianas escleroticas, hipertroficas e produzindo verdadeiros cistos, ás vezes com zonas calcificadas. Não raro, verificam-se miocardite e lezões das capsulas suprarenais ».

Fóra deste quadro geral, ficam, é claro, lezões outras localizadas em pontos diversos do organismo.

Este nosso trabalho abranjerá um conjunto de fatos histo-patolojicos já estabelecidos nos cazos humanos, com verificações em animais de laboratorio.

Descreveremos, em primeiro lugar, as alterações cardiacas e musculares, passando depois ás assinaladas no sistema nervozo, e por fim ás que são de séde glandular.

Entretanto só o faremos rezumidamente, rezervando a ampliação deste estudo para publicações posteriores, que enquadraremos em 7 capitulos, distribuidos nesta ordem: 1.° — *aparelho circulatorio e sistema muscular*; 2.° — *glandulas de secreções internas*; 3.° — *sistema nervozo*; 4.° — *aparelho respiratorio*; 5.° — *aparelho genito-urinario*; .6° — *aparelho dijestivo e glandulas anexas*; 7.° — *ossos, cartilajens, tecido conjuntivo e pele.*

ALTERAÇÕES CARDIACAS

O coração é uma das viceras de predileção do esquizotripano, quer no homem, quer nos animais.

Verificam-se lezões em todos os tecidos constitutivos do orgam, variando de intensidade e de aspeto conforme se trate de cazo agudo, cardiaco ou cronico.

stante Schwellung zahlreicher Lymphdrüsen der Bauchhöhle, des Mediastinums, des Halses, der Achselhöhlen und Inguines. — Je nach der Intensität der Krankheit, mehr oder weniger ausgesprochene, fettige Degeneration der Leber, die in den akuten Formen der bei Gelbfieber beobachteten gleichkömmt. — Leicht geschwollene und manchmal erweichte Milz. — Ganz konstantes Vorkommen von Schilddrüsenveränderungen in Form von Sklerose, Hypertrophie und wirklicher Zystenbildung, manchmal mit Verkalkungszonen. — Häufiges Bestehen von Myocarditis und Nebennierenveränderungen.

Ausser diesem Allgemeinbilde giebt es natürlich noch Veränderungen, die sich in verschiedenen Körperregionen lokalisieren.

Diese Arbeit soll einen Komplex histopathologischer Befunde umfassen, welche beim Menschen erhoben und bei Laboratoriumstieren kontrolliert wurden. Ich beschreibe in erster Linie die Herz- und Muskelveränderungen, wende mich dann zu denjenigen des Nervensystems und befasse mich schliesslich mit solchen der drüsigen Organe.

Es soll dies aber nur in aller Kürze geschehen, indem ich die Ausarbeitung des Themas auf spätere Publikationem verspare; dieselben sollen sieben Kapitel in folgender Anordnung umfassen: 1. Kreislaufsorgane und Muskelsystem. 2. Drüsen mit innerer Sekretion. 3. Nervensystem. 4. Atmungsorgane. 5. Urogenitalorgane. 6. Verdauungsapparat und zugehörige Drüsen. 7. Hämatopoietische Organe. 8. Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Haut.

VERAENDERUNGEN AM HERZEN.

Das Herz gehört zu den Organen, in welchen sich das Schizotrypanum vorzugsweise lokalisiert; man findet verschiedene Veränderungen in allen seinen Geweben, die in ihrer Intensität und in ihrem Aussehen wechseln, je nachdem die Krankheit akut, chronisch oder hauptsächlich durch Herzsymptome charakterisiert war.

Para clareza da expozição, descreveremos primeiramente as lezões das celulas nobres, depois as do tecido de sustentaculo, serozas e vazos.

Nos cazos nos quais o orgam é portador dos germens, encontram-se dentro dos segmentos de Weissmann espalhados por toda a espessura do musculo cardiaco, parazitos de forma arredondada, com um nucleo e blefaroplasto.

Estas formas do parazito variam muito numericamente no interior da celula cardiaca, vendo-se delles em divizão binaria. Celulas ha que possuem numero reduzido de protozoarios, em contraste com outras pejadas de centenas delles.

Nas celulas de numero muito diminuto de germens, estes localizam-se na parte central, perto do nucleo, isto é, no protoplasma não diferenciado.

Por multiplicação tomam a zona do sarcoplasma, atinjem á parte fibrilar que destroem localmente.

E' facil verificar em córtes transversas das fibras, excavações produzidas pelos esquizotripanos na parte contratil por elles ocupada.

Com a multiplicação sempre crecente do hospede, o processo destrutivo extende-se pelo maior eixo da celula, atinje os segmentos de Weissmann que com ella se unem, formando-se deste modo um cisto parazitario de grande volume.

A fibra assim lezada não aprezenta grande alteração em sua fibrilação, pois as estriações lonjitudinal e transversal continuam perfeitamente observaveis com os metodos ordinarios de coloração.

Ha, é certo, celulas nas quais o parazito, cauzou, quazi por completo, o dezaparecimento da parte diferenciada, reduzindo-as á membrana.

Verifica-se por vezes a multiplicação do nucleo e, raro, lijeira pigmentação no protoplasma.

Behufs grösserer Verständlichkeit werde ich zuerst die Veränderungen der spezifischen Organzellen beschreiben und nachher die des Stützgewebes, der Serosa und der Gefässe.

In den Fällen, in welchen das Herz Parasiten beherbergt, finden sich in den Weissmann'schen Segmenten über die ganze Dicke des Herzmuskels zerstreute Parasiten von runder Form mit Kern und Blepharoplast. Die Zahl dieser in den Herzmuskelzellen liegenden Parasitenformen schwankt sehr; viele derselben erscheinen in binärer Teilung begriffen. Während manche Zellen nur eine geringe Zahl von Protozoen aufweisen, zeigen sich dagegen andere von Hunderten derselben erfüllt.

Enthalten die Zellen nur eine sehr geringe Anzahl von Parasiten, so lokalisieren sich dieselben in den zentralen Teilen, in der Nähe des Kernes, d. h. im nicht differenzierten Teile des Protoplasma. Bei ihrer Vermehrung befallen sie die ganze Sarkoplasmazone und erreichen den fibrillären Anteil, welchen sie langsam zerstören. Auf Querschnitten der Fasern bemerkt man leicht Hohlräume, welche durch die Schizotrypanumformen in der von ihnen bewohnten kontraktilen Zone hinterlassen wurden.

Bei beständig weiterschreitender Vermehrung der Schmarotzer breitet sich der Zerstörungsprozess in der Längsaxe der Zelle aus und erreicht die Weissmann'schen Segmente, welche mit ihm verschmelzen und eine voluminöse Zyste parasitärer Natur bilden.

Die befallene Faser weist in ihrer Struktur keine grosse Veränderung auf, indem sich Längs- und Querstreifung bei den gewöhnlichen Färbemethoden erkennen lassen. Es giebt freilich Zellen, bei denen der Parasit den differenzierten Teil fast völlig zum Schwinden bringt, indem bloss eine Membran übrig bleibt.

Man beobachtet manchmal eine Vermehrung des Kernes und nicht selten eine leichte Pigmentierung im Protoplasma.

Muitas aprezentam ruturas de suas membranas, em determinados pontos onde, parece-nos, foi mais ativo o processo destruidor.

Quando se dá este fato, não raro, existem, perto do ponto onde se deu a rutura, esquizotripanos flajelados.

Estas formas do parazito pódem ser observadas no interior das fibras, principalmente naquellas que tem grandes reuniões parazitarias.

Cumpre referir ainda que existem cazos nos quais ha dejeneração bastante curioza da celula cardiaca, sem, comtudo, serem vistos aí parazitos, ao passo que a infeção é pozitivamente verificada em outras celulas do organismo.

No tecido conjuntivo disposto de permeio ás fibras, observam-se ora fenomenos inflamatorios generalizados (cazo agudo), ora fócos esparsos em varios pontos.

Nas inflamações encontram-se, muitas vezes, parazitos fagocitados ou não.

Os fenomenos inflamatorios são muitas vezes localizados ao redor de fibras parazitadas, mas não só, ha zonas infiltradas sem haver parazitos, como ha muitas celulas parazitadas sem reação pericelular.

Sempre que se dá rutura de uma fibra cardiaca, produz-se reação franca poi parte do tecido conjuntivo e elementos outros afluem para este ponto, certamente em defeza do orgam.

Aí é comum verem-se esquizotripanos fagocitados e outros já sobie fibras não parazitadas.

Além destes pontos reacionarios existem inflamações perivasculares, algumas bastante pronunciadas, outras apenas esboçadas.

Entretanto ha vazos que conservam a integridade morfolojica de suas paredes.

Nos cazos agudos verificámos fenomenos de pericardite e endocardite, mas debalde pesquizámos o parazito nestas lezões.

Num cazo da forma cardiaca os fenomenos de pericardite eram muito pronun-

Bei vielen Zellen zerreisst die Membran an bestimmten Stellen, wo, anscheinend, der Zerstörungsprozess besonders intensiv war. In diesem Falle finden sich nicht selten in der Nähe des Risses geisseltragende Schizotrypanumformen Man kann dies auch im Innern der Fasern beobachten, besonders solcher, welche grosse Parasitenansammlungen enthalten.

Es verdient auch, erwähnt zu werden, dass zuweilen eine ziemlich merkwürdige Degeneration der Herzmuskelzelle vorkömmt, ohne dass man daselbst Parasiten wahrnähme, während in anderen Zellen desselben Organismus die Infektion deutlich erkennbar ist.

An dem, zwischen den Muskelfasern gelegenen, Bindegewebe bemerkt man bald ausgebreitete Entzündungserscheinungen (in akuten Fällen), bald an verschiedenen Stellen zerstreute Herde. Bei den Entzündungen findet man häufig Parasiten, bald in Phagozyten, bald frei.

Die entzündlichen Erscheinungen treten häufig in der Umgebung parasitenhaltiger Fasern auf, indessen giebt es nicht nur entzündete Zonen ohne Parasiten, sondern auch von solchen befallene Zellen ohne perizelluläre Reaktion.

Reisst eine Herzmuskelfaser ein, so erfolgt immer eine deutliche Reaktion von Seite des Bindegewebes und es sammeln sich andere Elemente an diesem Punkte, unzweifelhaft zum Schutze des Organes. Hier sieht man dann häufig phagocyierte Schizotrypana und andere, bereits auf parasitenfreien Fasern gelegene.

Ausser diesen Reaktionspunkten giebt es noch, zum Teil sehr deutliche, zum Teile kaum angedeutete, perivaskuläre Entzündungen. Es giebt aber auch Gefässe, deren Wände eine morphologische Integrität aufweisen.

In akuten Fällen beobachtete ich Erscheinungen von Peri- und Endocarditis, suchte aber vergebens nach Parasiten in diesen Läsionen.

In einem Falle mit Herzerscheinungen waren die Zeichen von Pericarditis besonders deutlich, indem sich auch

ciados, havendo mesmo pontos hemorrajicos; a miocardite e a lezão cardio-celular igualmente nitidas.

Até agora não nos foi possivel encontrar alterações nos grandes vazos cardiacos que temos estudado.

MUSCULOS ESTRIADOS.

Na esquizotripanoze o musculo é ponto dos mais prediletos para a multiplicação do parazito. Verificámos a sua infestação na cobaia, um mez apoz a inoculação; e, em seguida, nos musculos humanos.

Pensamos atualmente que o musculo e o coração formam a pedra de toque para o diagnostico histo-patolojico da molestia de CHAGAS. O tecido muscular, poucos dias apoz a inoculação de sangue parazitado na cobaia, já se acha lezado pelo tripanozomo.

Suas alterações são muito curiozas, quer pelo modo de se comportar da celula, quer pelas reações do endomizio.

Os musculos do homem e animais esquizotripanozicos nem todos se acham atacados pelo elemento invazor, porém muites delles aprezentam lezões em grande percurso. Em cobaias infetadas verifiquei, algumas vezes, os musculos da perna e o psoas abranjidos em todo o seu comprimento.

Em cazos humanos constatei a infeção em grandes extensões dos musculos da perna, dorso, braço, etc.

A celula muscular estriada, como a celula cardiaca, póde ter em seu interior, numero variavel de parazitos: umas, onde se inicia o processo, mostram raros exemplares; outras, ao contrario, deixam vêr milhares de individuos.

Geralmente estes grandes acumulos de parazitos tomam a forma de fuzo, na parte central da fibra, sem deformar-lhe o contorno. A integridade da estriação é per-

punktförmige Hämorrhagien vorfanden; die interstitielle Myocarditis und die Läsionen der Herzmuskelzellen waren gleichfalls deutlich.

Bis jetzt war es mir nicht möglich, an den von mir studierten grossen Herzgefässen Veränderungen zu entdecken.

ALLGEMEINE WILLKUERLICHE MUSKULATUR.

Bei der Schizotrypanose ist die Muskulatur ein Ort der Wahl für die Vermehrung des Parasiten. Ich beobachtete deren Infektion beim Meerschweinchen einen Monat nach der Einimpfung und später in den menschlichen Muskeln.

Ich glaube zur Zeit, dass das Herz und die willkürlichen Muskeln bei der histo-pathologischen Diagnose der Krankheit von CHAGAS den Prüfstein bilden. Das Muskelgewebe des Meerschweinchens zeigt, bereits wenige Tage nach der Einspritzung des parasitenhaltigen Blutes, von Trypanosomen herrührende Läsionen.

Zwei Veränderungen sind besonders merkwürdig, sowohl wegen des Verhaltens der Zelle selbst, als wegen der Reaktion von Seiten des Endomysiums.

Bei der Schizotrypanose des Menschen und der Tiere werden nicht alle Muskeln von der Invasion befallen, aber viele derselben zeigen Läsionen in weiter Ausdehnung. Bei infizierten Meerschweinchen beobachtete ich einige Male, dass Psoas und Beinmuskulatur in ihrer ganzen Länge ergriffen waren. Beim Menschen fand ich eine sehr ausgedehnte Infektion der Bein-, Arm- und Rückenmuskulatur.

Wie die Herzmuskelzelle, kann auch diejenige der Körpermuskeln in ihrem Innern eine wechselnde Zahl von Parasiten aufweisen; solche, bei denen der Prozess im Beginn ist, zeigen nur wenige Exemplare, andere dagegen Tausende von Individuen.

Gewöhnlich nehmen grosse Parasitenanhäufungen im zentralen Teile der Faser eine Spindelform an, ohne deren Umriss zu stören. Die gute Erhaltung der Strei-

feitamente patente, mesmo perto dos pontos destruidos (Estampa 14. Fig. 1).

Em nada, na maioria das fibras, é alterada a coloração pelos metodos habibituais de investigações histolojicas.

Nos cazos nos quais o parazito se dispunha na periferia da substancia estriada, logo abaixo do sarcolema, certamente no sarcoplasma, verificava-se a destruição da parte diferenciada e a reprodução do parazito.

Vimos algumas fibras cuja fibrilação havia dezaparecido, ficando em seu lugar substancia hialina.

Estas fibras parazitadas não aprezentam, em alguns cazos, alteração alguma reveladora da reação celular contra o elemento invazor, nem o endomizio se modifica em sua vizinhança; outras, porém, deixam vêr que a proliferação nuclear é um fato, e mais que a reação inflamatoria se estabelece intensamente nas circumvizinhanças do ponto afetado.

Chegado a certo ponto de plenitude, isto é, quando não mais o sarcolema póde conter os esquizotripanos dezenvolvidos no seu interior, dá-se a rutura em alguns pontos do elemento anatomico, e parazitos, uns ainda redondos, outros já flajelados, são lançados nos intersticios das fibras musculares.

Em córtes transversais esta evolução póde ser seguida a passo, e as figuras 2—4 da estampa 14 reprezentam as suas principais fazes. Muitas vezes não se vê no ponto mais dilatado do fuzo de parazitos fibrilas musculares, estando aí a celula reduzida a pequena camada de protoplasma e membrana.

Dada a rutura do elemento muscular, os parazitos, como já dissemos, vão ter ao endomizio onde são vistos izolados, incluidos em celulas de defeza e justapostos a outras fibras.

Estas fibras aprezentam-se umas infetadas por algumas unidades parazitarias, e outras integras, parecendo que as infetadas

fung ist selbst in der Nähe der Zerstörungsherde vollständig klar. (Tafel 14. Fig. 1).

Bei Anwendung der gebräuchlichen Färbemethoden zeigt sich bei der Mehrzahl der Fasern die Färbung durchaus nicht verändert.

In den Fällen, wo die Parasiten in der Peripherie der gestreiften Substanz dicht unter dem Sarcolemm und sicher im Sarcoplasma lagen, beobachtete ich eine Zerstörung des differenzierten Anteiles und eine Reproduktion des Parasiten.

Ich sah einige Fasern, bei denen die Faserung verschwunden und eine hyaline Substanz an deren Stelle getreten war.

In manchen Fällen zeigen solche infizierte Fasern keine Veränderung, welche eine Reaktion der Zelle gegen das invadierende Element beweist, noch wird das Endomysium in ihrer Nachbarschaft modifiziert; andere dagegen zeigen das tatsächliche Vorkommen einer Kernvermehrung und überdies das Auftreten einer intensiven entzündlichen Reaktion in der Umgebung des befallenen Punktes.

Nach einer kurzen Periode der Anfüllung, wenn das Sarcolemm die in seinem Innern sich entwickelnden Parasiten nicht mehr aufnehmen kann, erfolgt die Ruptur der Zelle an einigen Punkten und die teils runden, teils bereits geisseltragenden Parasiten ergiessen sich in die Interstitien der Muskelfasern.

Auf Querschnitten kann dieser Vorgang Schritt für Schritt verfolgt werden und Taf. 14. Fig. 2—4 zeigt seine hauptsächlichsten Phasen. Oft sieht man am breitesten Teile der Parasitenspindel keine Fibrillen mehr, da die Zelle hier auf die Membran und eine dünne Protoplasmaschicht reduziert ist.

Wie gesagt, gelangen die Parasiten nach erfolgter Ruptur des Muskelelementes ins Endomysium, wo sie, einzeln in zur Abwehr dienenden Zellen eingeschlossen und anderen Fasern angelagert, angetroffen werden. Diese Fasern erscheinen bald unversehrt, bald mit einigen Parasiten infiziert, wobei die letzteren anschei-

são as que com mais facilidade deixaram o parazito atravessar a membrana.

A multiplicação nuclear, apoz a saida de parazitos, ativa-se; a fibra é invadida por celulas migradoras; os nucleos das celulas, envolvidos por camada protoplasmica, misturam-se com os elementos para aí aportados. No ponto no qual a fibra foi destruida, não raro apoz o que acabamos de referir, vêm-se como se fossem tubos cheios de elementos reacionarios, os restos do sarcolema.

Para o lado do tecido conjuntivo dos musculos infetados, é facil, mesmo com aumento fraco, verificar zonas de infiltração mais ou menos extensas, constituidas por celulas frequentemente mononucleares.

Os vazos que irrigam os musculos infetados, principalmente os de pequeno calibre, sofrem infiltração celular de suas paredes, sobretudo da externa.

SISTEMA NERVOZO.

Nesta parte o nosso estudo abranjerá somente lezões do sistema nervozo central e principalmente observadas na forma aguda da molestia.

Quanto ao sistema nervozo periferico, as nossas observações até agora feitas não nos autorizam a estabelecer de modo absoluto as lezões patolojicas nelle encontradas.

Num cazo agudo, bastante parazitado, verificámos, mesmo com fraco poder ampliador, e em córtes de qualquer parte do tecido nervozo, córados por qualquer processo, modificações morbidas muito pronunciadas do tecido nobre, bem como, em menor intensidade, lezões vasculares e meninjeanas.

No cerebro, cerebelo, nucleos da baze, protuberancia, bulbo, medula em varios segmentos, viam-se fócos inflamatorios espalhados em toda a substancia nervoza, quer branca, quer parda, e destacaveis ao mais superficial exame microscopico.

Variando muito de tamanho, sem distribuição regular, esses fócos, em sua

nend eine für den Parasiten leichter durchgängige Membran besitzen.

Nach dem Austritte der Parasiten wird die Kernvermehrung eine lebhaftere; Wanderzellen dringen in die Muskelfaser ein und die von einer Plasmaschicht umgebenen Kerne vermischen sich mit den eingedrungenen Elementen, so dass nicht selten später, an Stelle der zerstörten Faser, die Reste des Sarcolemms als ein mit Entzündungsprodukten erfüllter Schlauch erscheinen.

Am Bindegewebe der infizierten Muskel kann man, bereits mit schwacher Vergrösserung, mehr oder weniger ausgedehnte Entzündungsherde konstatieren, welche von — häufig einkernigen — Zellen gebildet sind.

Die Gefässe, welche die infizierten Muskel bedienen und zwar besonders die feineren, zeigen eine zellige Infiltration der Wandschichten, namentlich der äussersten.

NERVENSYSTEM.

Hier befassen sich meine Studien nur mit den Veränderungen am zentralen Nervensystem und zwar besonders denjenigen der akuten Erkrankungen. Die Beobachtungen, welche ich am peripherischen Nervensystem angestellt habe, gestatten mir nicht, in absoluter Weise, daselbst vorkommende pathologische Zustände aufzustellen.

In einem akuten. an Parasiten ziemlich reichen Falle konstatierte ich, schon mit schwacher Vergrösserung und in beliebig gefärbten Schnitten irgend eines Teiles des Zentralnervensystems, sehr ausgedehnte krankhafte Veränderungen des spezifischen funktionellen Gewebes und auch, obwohl in geringerem Masse, Veränderungen an Gefässen und Meningen.

Im Gross- und Kleinhirn, in den Nervenkernen der Basis, Brücke und Medulla oblongata und in verschiedenen Rückenmarksabschnitten sah man in der ganzen Nervensubstanz, der weissen, wie der grauen, verteilte Entzündungsherde, die schon bei ganz oberflächlicher mikrosko-

maioria, não mantêm relações diretas com as paredes dos vazos.

Ha, é certo, zonas de infiltração leucocitaria, dispostas nas proximidades delles, e que, por vezes os envolvem completamente. A exame mais acurado e com auxilio de lentes mais poderozas, descobre-se o parazito em muitos dos citados pontos reacionarios.

Em numero variavel, quazi sempre incluzos em celulas de nucleo unico ou polimorfo, o esquizotripano aprezenta, em geral, a forma arredondada que já vimos nas lezões cardiacas.

Nas zonas inflamatorias, não é fato excecional verificar-se a prezença de celulas nervozas mais ou menos alteradas.

Tornou-se curiozo para nós verificar a diminuição numerica dos parazitos, na maioria de vezes, sua auzencia nos pontos nos quais a extensão do processo inflamatorio havia adquirido grande intensidade e abranjido vasta zona, em comparação com outros, nas suas cercanias colocados, nos quais, percebendo-se o inicio da destruição do tecido hospedeiro, via-se o protozoario, variando apenas numericamente.

Estes fatos induziram-nos a concluir lojicamente pelo dezaparecimento do fator morbido *in loco*, ao aumentar da reação inflamatoria.

Observação mais pertinaz realizada no intuito de elucidar o ponto de orijem das infiltrações leucocitarias, esclareceu-nos em grande parte o cazo, mas não consideramos todo o assunto desvendado.

Na substancia branca medular encontrámos, como tipo, uma reunião de parazitos todos redondos, colocados dentro de uma celula enormemente aumentada de volume, sem que a menor reação inflamatoria se revelasse nesse ponto.

Retomámos o estudo dos córtes do nevraxe e verificámos a reprodução do fato referido em todo o sistema nervozo central.

pischer Untersuchung hervortraten. Diese Herde, von sehr wechselnder Grösse und unregelmässiger Verteilung, stehen in keiner direkten Verbindung zu den Gefässwänden.

In ihrer Umgebung und manchmal dieselben vollständig umhüllend, finden sich freilich Zonen von Leukozyteninfiltration und bei eingehender Untersuchung mit stärkerer Vergrösserung erkennt man die Parasiten in vielen dieser Entzündungsherde.

Das Schizotrypanum erscheint in wechselnder Anzahl, fast immer in Zellen mit einzigem, einfachen oder polymorphen Kerne eingeschlosen und zeigt gewöhnlich die schon bei den Herzveränderungen erwähnte abgerundete Form.

Das Vorkommen mehr oder weniger veränderter Ganglienzellen in den Entzündungsherden wird nicht bloss ausnahmsweise beobachtet.

Es war mir interessant, festzustellen, dass an den Stellen, wo der Entzündungsprozess eine grosse Intensität und weite Ausdehnung erreicht hatte, die Parasiten seltener wurden und meistens verschwanden, im Gegensatz zu anderen, in der Nähe gelegenen, bei denen man erst den Anfang der Zerstörung der Wirtsgewebe sah und welche die Protozoen immer, wiewohl in wechselnder Zahl enthielten. Diese Tatsachen liessen logischer Weise darauf schliessen, dass der Krankheitserreger in Folge der zunehmenden Entzündungserscheinungen an Ort und Stelle verschwindet.

Zur Aufklärung des Ausgangspunktes der Leukozyteninfiltration machte ich eingehendere Beobachtungen, die mich über diesen Punkt ziemlich aufklärten; doch kann ich die Frage noch nicht als vollständig erledigt betrachten.

In der weissen Rückenmarkssubstanz findet man, typischer Weise, Anhäufungen ausschliesslich runder Parasiten, im Innern je einer enorm vergrösserten Zelle, ohne dass sich an der Stelle die geringste Entzündungsreaktion vorfände. Zum Studium der Schnitte des Zentralnervensystems zurückkehrend, bestätigte ich die angeführte

Julgamos daí que é esta uma das primeiras fazes do ataque contra o eixo cefalo-espinhal na molestia de CHAGAS.

Vêm-se celulas redondas, com um unico nucleo, muito aumentado de volume, contendo em seu interior grande copia de esquizotripanos, sem que exista o minimo processo inflamatorio na vizinhança (Est. 15, Fig. 1).

A celula parazitada julgamos ser sempre de nevroglia, mas esta afirmativa não póde ainda ser confirmada em absoluto com os estudos procedidos.

Leva-nos a esta propozição, isto é, a considerar a celula como de nevroglia, além da sua pozição no tecido, estrutura do seu nucleo, suas relações com os outros elementos, a circumstancia de nunca termos visto celula nervoza ou leucocito parazitado que não estivesse em fóco reacionario, emquanto que, neste cazo, ella fica izolada, córando-se com facilidade, e, como já dissemos, sem ataque por celulas migradoras.

Por divizões binarias sucessivas os parazitos aumentam numericamente, destroem o protoplasma, forçam a membrana a distender-se, hipertrofiando deste modo colossalmente o elemento anatomico que os contem.

Por vezes, mas o fato não chega a ser frequentemente observado, os esquizotripanos tornam-se flajelados ainda dentro da celula infestada (Est. 15, Fig. 4).

Esta verificação, tendo em consideração o que vimos já em outras celulas hospedeiras do parazito, induz-nos a crêr que a membrana da celula ou é perfurada pelo protozoario já flajelado, que no pensar de CHAGAS reprezenta a forma adulta, ou a rutura se dá pela pressão exercida pelos parazitos, de dentro para fóra.

Quer de um modo, quer de outro, realizado o fenomeno, é o ponto invadido por celulas reacionarias que para aí afluem em grande numero.

Nesta faze vêm-se celulas aí chegadas conterem 3, 4 e mais parazitos, ao lado de muitas outras inteiramente desprovidas del-

Beobachtung in seinem ganzen Verlaufe. Ich schloss daraus, dass es sich in diesem Falle von CHAGAS'scher Krankheit um die ersten Stadien der Invasion des Gehirnes und Rückenmarkes handle.

Man sieht runde, einkernige Zellen, welche in ihren Innern eine grosse Menge von Schizotrypanen enthalten, ohne dass sich in der Nachbarschaft der geringste Entzündungsprozess auffinden liesse (Taf. 15, Fig. 1).

Ich erachte, dass die invadierten Zellen der Neuroglia angehören, doch genügen die bisherigen Untersuchungen nicht, um diese Behauptung absolut sicher zu machen. Für Neurogliazellen halte ich sie nicht nur wegen ihrer Lage im Gewebe, ihrer Kernstruktur und ihren Beziehungen zu anderen Elementen, sondern auch wegen des Umstandes, dass ich, ausserhalb von Entzündungsherden, niemals parasitenhaltige Ganglienzellen oder Leukozyten gesehen habe, während diese Zellen isoliert, gut färbbar und ohne Beziehung zu Wanderzellen erscheinen.

Die Parasiten vermehren sich durch successive Zweiteilung, zerstören das Protoplasma und dehnen die Membran derart, dass eine kolossale Hypertrophie der sie enthaltenden Zelle entsteht.

Zuweilen erhalten die Parasiten Geisseln, während sie noch in der befallenen Zelle eingeschlossen sind, doch ist dies nicht eben häufig (Taf. 15, Fig. 4). In Berücksichtigung dessen, was wir bereits an anderen parasitenhaltigen Zellen beobachteten, führt mich diese Beobachtung zu der Annahme, dass die Zellmembran entweder durch bereits geisseltragende (nach CHAGAS erwachsene) Flagellaten perforiert wird, oder dass die Ruptur, in Folge des inneren, durch die Parasiten ausgeübten Druckes, zu Stande kömmt.

Wenn dieses Ereignis eintritt, gleichviel wie, so wird die Stelle von einer grossen Anzahl herbeiströmender Wanderzellen invadiert. Man sieht jetzt die hier angesammelten Zellen drei, vier und mehr Parasiten beherbergen, während viele andere völlig frei erscheinen. In solchen

les. Nestes fócos dá-se o dezaparecimento do parazito com o progredir da reação, conforme referimos antes.

Do que observámos parece podermos afirmar que o tripanozomida penetra na celula, multiplica-se por divizão binaria, rompe a membrana e sái, motivando nessa ocazião reação grande, na qual, não raro, perecem celulas nervozas.

Estes fatos foram verificados em todo o sistema nervozo do cazo agudo, predominando os elementos parazitados e os fócos de reação nos nucleos centrais, protuberancia e medula.

Entretanto, no cerebelo apenas encontrámos fócos inflamatorios, mas não vimos celulas cheias de parazitos.

O processo inflamatorio meninjeano assemelha-se bastante ao seu similar nas outras tripanozomiazes.

Nas arterias que irrigam a substancia nervoza encontram-se, em muitas dellas, fenomenos francos de peri-arterite.

Ha, portanto, na molestia de CHAGAS meningo-encefalo-mielite.

Os elementos constituitivos destes dois processos, e as alterações dos elementos nervozos serão estudados em trabalho posterior a este.

GLANDULAS.

Multiplas são as alterações acarretadas para estes organs pela molestia de CHAGAS.

As observações clinicas do descobridor desta nova entidade morbida, mostram que ha sempre, em todos os cazos, lezões importantes neste sistema organico e que, em muitos delles, o quadro morbido gira em torno da alteração funcional do parenquima de determinada glandula.

Não falando da tireoide que CHAGAS encontrou sempre lezada, quer no inicio, quer durante a evolução da molestia, em centenas de cazos, outras glandulas mostram tambem alterações funcionais muito importantes.

Herden erfolgt das Verschwinden des Parasiten mit fortschreitender Reaktion, wie ich schon oben auseinandersetzte.

Aus diesen Beobachtungen kann man, wie ich glaube, den Schluss ziehen, dass das Trypanosoma in die Zelle eindringt, sich dort durch Zweiteilung vermehrt, die Membran sprengt und schliesslich austritt, wobei eine starke Reaktion hervorgerufen wird, bei welcher nicht selten Nervenzellen zu Grunde gehen.

Diese Befunde wurden im ganzen zentralen Nervensystem des akuten Falles erhoben, wobei befallene Zellen und Erzündungsherde besonders vorwiegend in den zentralen Kernen, Pons und Rückenmark gefunden wurden.

Im Kleinhirn habe ich übrigens nur Entzündungsherde gefunden, in denen keine parasitenhaltige Zellen vorkamen.

Die Entzündung der Meningen stellt einen, demjenigen bei anderen Trypanosomiasisarten sehr ähnlichen, Prozess vor.

Bei vielen der Arterien, welche die Nervensubstanz versehen, erkennt man leichte periarteriitische Erscheinungen.

Man findet also bei der Krankheit von CHAGAS eine Meningo-encephalo-myelitis. Die Vorgänge bei diesen Prozessen und die Veränderungen an den Elementen des Nervensystems sollen in einer späteren Arbeit studiert werden.

DRÜSEN.

Die Veränderungen, welche die Schizotrypanose in den drüsigen Organen herbeiführt, sind mannigfacher Natur.

Die klinischen Beobachtungen des Entdeckers dieser neuen Krankheitseinheit zeigen, dass, in dieser Gruppe von Organen, bei allen Fällen wichtige Veränderungen vorkommen und dass bei vielen das Krankheitsbild sich um Funktionsstörungen des Parenchymes einer bestimmten Drüse dreht.

Es war mir bei meinen Studien unmöglich, dieses Thema zu erschöpfen und die Veränderungen sämmtlicher Drüsen aufzuklären.

Não nos foi possivel levar o nosso estudo a cabo neste assunto, deixando perfeitamente elucidadas as lezões de todas as glandulas.

Trataremos apenas da tireoide, capsula supra-renal, ovario e testiculo, assinalando desde já que verificámos a reação inflamatoria no rim, hipofize e glandula parotida de animais infetados.

TIREOIDE. — Nos cazos agudos da molestia verifica-se pela palpação o endurecimento da glandula.

Nos córtes ha pontos inflamatorios no tecido conjuntivo do orgam e escleroze muito pronunciada em alguns cazos.

As veziculas tireoidianas mostram-se diminuidas de volume, algumas mesmo com a luz muito reduzida.

Raras são as veziculas, na tireoide esclerozada, que aprezentam cavidades medianamente constituidas, e a substancia coloide que existe em seu interior, em muitas, é modificada em sua cromofilia.

As celulas glandulares em certas veziculas destacam-se em grande numero, sendo encontradas na substancia coloide.

Este fato verifica-se com facilidade em glandulas de animais nas quais as celulas destacadas se aprezentam muito dejeneradas.

As ilhotas epiteliais que normalmente existem entre as veziculas tireoidianas, aparentam haver sofrido multiplicação de suas celulas.

Estas massas epiteliais existem profuzamente disseminadas e, em muitas veziculas, prolongam-se por toda a superficie.

Em cazos cronicos ha fócos fibrozos de grande extensão no interior da glandula e os fócos inflamatorios são muito pronunciados em alguns pontos da tireoide.

Muitos destes fócos são portadores de cistos de volume variavel e de conteúdo diverso: uns são pequenos, de substancia coloide; outros desta mesma substancia,

Abgesehen von der Thyreoidea, welche CHAGAS immer verändert fand, ebensowohl im Beginne, als während des Verlaufes von Hunderten von Krankheitsfällen, zeigen auch andere Drüsen sehr wichtige Funktionsstörungen.

Ich werde nur Schilddrüse, Nebennieren, Ovarien und Hoden besprechen, betone aber schon jetzt, dass ich eine enzündliche Reaktion auch in den Nieren, der Hypophyse und den Ohrspeicheldrüsen beobachtet habe.

SCHILDDRÜSE: In akuten Fällen konstatiert man durch Palpation die Verhärtung der Drüse.

Auf Schnitten findet man im Bindegewebe dieses Organes entzündete Stellen und in manchen Fällen eine sehr ausgesprochene Sklerose. Die Schilddrüsenbläschen erscheinen sehr verkleinert und einige zeigen selbst ein sehr reduziertes Lumen.

Bei der sklerotischen Schilddrüse zeigen nur wenige Bläschen mittelgrosse Höhlungen und die in ihrem Innern vorhandene Kolloidsubstanz ist oft in ihrer Färbbarkeit verändert.

In manchen Bläschen lösen sich zahlreiche Drüsenzellen ab und werden in der Kolloidsubstanz gefunden. Diese Tatsache beobachtet man leicht bei den Drüsen von Tieren, bei welchen die abgelösten Zellen stark degeneriert erscheinen.

Die Epithelinseln, welche normalerweise zwischen den Schilddrüsenbläschen vorkommen, scheinen eine Vermehrung der Zellen zu erleiden.

Diese Epithelialmassen kommen reichlich zerstreut vor und erstrecken sich in vielen Bläschen über die ganze Oberfläche.

Bei chronischen Fällen trifft man sehr ausgedehnte fibröse Herde im Innern der Drüse und an manchen Stellen derselben sind die Entzündungsherde sehr ausgesprochen.

Viele dieser Herde zeigen Zysten von wechselnder Grösse mit verschiedenem Inhalte: einige sind klein und kolloidhaltig; andere, jedoch viel grössere, ent-

mas de volume bastante grande, e ainda outros contendo liquido e cujas paredes são, em parte ou totalmente, calcificadas.

Ha, entretanto, cazos cronicos, nos quais não se verifica a formação de cistos, revelando então a glandula grande quantidade de tecido epitelial intervezicular, escleroze e veziculas pequenas e alteradas.

Nessas glandulas os vazos sofrem processos histopatolojicos semelhantes aos que foram encontrados nos vazos do coração.

Capsula supra renal. — E' orgam bastante lezado nesta molestia, extendendo-se a lezão a todas as camadas da glandula.

Em um cazo cronico da molestia, de forma cardiaca, o Dr. Chagas rejistou a *coloração bronzea* da pele, como provavel consequencia de lezões das capsulas supra-renais.

Na autopsia, estes organs estavam aumentados de volume, aprezentavam, ao córte, a camada medular muito acrecida e de um branco mate.

Córtes destes organs mostram, quer na camada cortical, quer na medular, lezões de celulas glandulares e fócos inflamatorios. A persistencia destas lezões foi por nós verificada em outros cazos, com outras formas, da molestia de Chagas.

E' possivel que o parazito penetre nas celulas glandulares, se multipliquem e, acarretando a destruição dellas, provoque a reação inflamatoria.

Esta propozição, que só em hipoteze podemos estabelecer para os cazos humanos, já foi verificada em animais de experiencia, como se póde ver no dezenho dum orgam de cobaia, em uma celula da camada faciculada (Estampa 15, Fig. 2).

As lezões vasculares inflamatorias nestes organs são identicas ás que foram já assinaladas.

Ovario. — Nossas observações neste orgam utilizaram o material dum cazo cronico humano, e de varios animais infetados.

halten dieselbe Substanz; noch andere enthalten zwar Flüssigkeit, aber ihre Wandung ist ganz oder teilweise verkalkt.

Es gibt aber auch chronische Fälle, bei denen man keine Zystenbildung findet und die Drüse eine grosse Menge von intravesikulären Epithelien, Skleroseherden und kleinen veränderten Bläschen aufweist.

In diesen Drüsen erleiden die Gefässe ähnliche histo-pathologische Veränderungen, wie sie bei den Herzgefässen gefunden wurden.

Nebenniere. — Dieses Organ ist bei unserer Krankheit ziemlich verändert und die Läsionen erstrecken sich auf alle Schichten der Drüse.

In einem chronischen, von Herzerscheinungen begleiteten, Falle dieser Krankheit verzeichnete Dr. Chagas eine Bronzefärbung der Haut als wahrscheinliche Folge von Veränderungen der Nebennieren.

Bei der Autopsie fand man diese Organe vergrössert und auf dem Schnitte erschien die Markschicht sehr verbreitert und mattweiss.

Mikroskopische Schnitte zeigen, sowohl in der Rindenschicht, als auch im Marke, Veränderungen der Drüsenzellen und entzündliche Herde. Das Bestehen solcher Veränderungen wurde von mir bei anderen Formen der neuen Krankheit festgestellt.

Es ist möglich, dass der Parasit in die Drüsenzellen eindringt und durch seine Vermehrung ihre Schädigung herbeiführt, welcher die entzündliche Reaktion folgt. Dieser Satz, den ich beim Menschen nur als Vermutung aufstellen kann, wurde schon an Versuchstieren konstatiert, wie man aus der Abbildung sieht, die eine Zelle aus der Fasciculärschicht zeigt (Taf. 15, Fig. 2).

Auch in diesem Organe sind die Entzündungserscheinungen an den Gefässen den bereits geschilderten ähnlich.

Ovarium. — Bei meinen Untersuchungen dieses Organes verwandte ich das Material von einer chronischen Krankheits-

No cazo humano eram ambos os ovarios portadores de volumozo cisto coloide, limitado por um tecido esclerotico.

A glandula toda, quer na parte central, quer na periferica, era séde de reação inflamatoria e de escleroze.

Em animais verificámos alguns cistos de pequeno tamanho, com substancia cromaticamente comparavel á substancia mucoide.

Em redor delles havia tecido inflamatorio e, algumas vezes, esclerozante.

Possuiam foliculos normais em todas as fazes evolutivas e, raramente, os encontrámos muito lezados.

Não verificámos a prezença do esquizotripano nesses organs, mesmo nos que aprezentavam maior reação inflamatoria.

Os vazos, por vezes, revelavam-se inflamados.

TESTICULO. — Todo o nosso trabalho sobre esta glandula foi feito em organs de cobaias infetadas, pois não lográmos obter ainda material humano.

Na esquizotripanoze da cobaia o testiculo é um dos organs mais sériamente lezados pelo germen da molestia.

As lezões abranjem não só a parte nobre da glandula genetica, como a interstical, e os envolucros. Os tubos seminais mostram-se, em quazi todos os cazos, com gráos varios de alterações.

Assim é que, ao mais superficial exame, detem a nossa atenção o aspeto de tubos glandulares, reduzidos a uma unica camada de celulas alteradas e diversamente córadas em relação ás de outros tubos.

Revelaram-se mais, em varios pontos, zonas de orquite, ao mesmo tempo que outros pontos se conservavam integros.

Sob observação mais atenta, melhor se vêm tubos que se aprezentam sem a menor alteração estrutural, ao lado de outros cujas alterações são enormes.

form des Menschen und verschiedene infizierte Tiere.

Beim Menschen fand sich in beiden Ovarien eine volumöse Kolloidzyste, die von sklerotischem Gewebe begrenzt war.

Die ganze Drüse, sowohl in der Peripherie, wie im Zentrum, war der Sitz entzündlicher Reaktion und Sklerosierung.

Bei Tieren konstatierte ich einige Zysten von geringer Grösse, deren Inhalt bei der Färbung sich der Schleimsubstanz ähnlich verhielt. Um diese fand sich entzündliches und manchmal sklerotisches Gewebe. Die Ovarien zeigten normale Follikel in allen Entwicklungsstadien und nur selten fand ich dieselben deutlich geschädigt. Die Gegenwart des Schizotrypanum konnte in diesen Organen nicht konstatiert werden, selbst dann, wenn die entzündliche Reaktion sehr hochgradig war.

Die Gefässe zeigten zuweilen Entzündungserscheinungen.

TESTIKEL. — Alle meine Studien über diese Drüsen wurden an Organen von infizierten Meerschweinchen angestellt, da es mir nicht gelang, menschliches Material zu erhalten.

Bei der Schizotrypanose des Meerschweinchens ist der Hoden eines der durch den Krankheitserreger am schwersten geschädigten Organe.

Die Läsionen umfassen nicht nur den Drüsenteil desselben, sondern auch das interstitielle Gewebe und die äusseren Hüllen. An den Samenkanälchen sieht man fast in allen Fällen Veränderungen verschiedenen Grades.

So wird, auch bei der oberflächlichsten Untersuchung, die Aufmerksamkeit durch die Erscheinung von Kanälchen gefesselt, welche auf eine Schicht veränderter und sich anders färbender Zellen reduziert sind.

Es zeigen sich an verschiedenen Stellen Herde von Orchitis, während gleichzeitig andere Stellen intakt erscheinen.

Bei genauerer Untersuchung erkennt man noch deutlicher Kanälchen ohne

Nas glandulas espermaticas atacadas pelo esquizotripano, canais seminiferos existem com multiplas porções de sua parede em perfeita atividade, ao passo que em outras ha celulas muito aumentadas de volume, cheias de parazitos, geralmente redondos mas, por vezes, já flajelados.

Em córtes seriados deste orgam, vêm-se tubos que em uns córtes aprezentam estrutura integra, em outros alterada.

Ha mesmo tubos que apenas tem uma ou outra forma parazitaria, no interior ou fóra de celulas da parede, por vezes em divizão.

Certamente será esta a primeira faze da infestação testicular.

As celulas que no tubo mais vezes e por maior numero, se encontram parazitadas são as da camada bazal, mas o processo agressivo não lhes é restrito, podendo invadir todas as outras celulas, até mesmo as da camada superior.

Vezes ha, nas quais os elementos hospedeiros se destacam da parede, mais ou menos cheios de parazitos, são levados até a luz tubular e, de lá, acarretados pelo liquido espermatico.

Nestes elementos hospedeiros vêm-se apenas o nucleo, a membrana e, dentro della um numero enorme de esquizotripanos.

A fig. 1 da estampa 16 reprezenta o córte obliquo dum canal, córado pelo metodo de Giemsa, mostrando o que acabamos de referir.

Além disso vêm-se parazitos izolados e celulas completamente dejeneradas, com enorme quantidade de esquizotripanos no seu interior.

A proporção que a infestação progride á custa da reprodução dos parazitos, rutura das celulas e parazitação de outras,

jegliche Änderung der Struktur, neben solchen, welche enorme Veränderungen aufweisen.

Bei den vom Schizotrypanum befallenen Samendrüsen finden sich Samenkanälchen, bei denen viele Portionen der Wandung in voller Tätigkeit begriffen sind, während in anderen die Zellen sehr vergrössert und von Parasiten erfüllt sind; letztere sind gewöhnlich rund, manchmal aber bereits mit Geisseln versehen. In Serienschnitten durch dieses Organ sieht man Kanälchen, welche in einigen Schnitten normale, in andern pathologische Struktur zeigen. Es finden sich auch Tuben, welche nur eine oder andere parasitäre Form, manchmal in Teilung begriffen, im Innern oder ausserhalb der Wandzellen aufweisen. Gewiss repräsentiert dies die erste Phase der Hodeninfektion.

Die Zellen, welche in den Kanälchen am häufigsten und zahlreichsten befallen werden, sind diejenigen der Basalschicht; doch beschränkt der Prozess seine Angriffe nicht auf diese allein, vielmehr kann er alle anderen Zellen, auch die der oberflächlichen Schicht befallen.

Es kommt vor, dass die infizierten Zellen sich, mehr oder weniger voll von Parasiten, von der Wandung ablösen, ins Lumen der Tubuli gerathen und von da mit der Samenflüsigkeit weiter geführt werden.

In solchen infizierten Zellen sieht man nur den Kern und die Membran, sowie im Innern der letzteren eine ungeheure Zahl von Schizotrypanumformen.

Fig. 1, Taf. 16 zeigt einen, nach Giemsa gefärbten Schrägschnitt durch ein Kanälchen, welcher das geschilderte illustriert. Ausserdem sieht man isolierte Parasiten und vollständig degenerierte Zellen mit einer enormen Menge von Krankheitserregern in ihrem Innern.

In dem Maasse, wie die Infektion durch Vermehrung der Parasiten, Ruptur der Zellmembranen und Infektion neuer Zellen fortschreitet, verliert das Kanälchen

o tubo glandular sofre perda de elementos da sua parede, ficando por fim reduzido a uma unica camada de celulas e estas mesmo em dejeneração.

Neste estado a prezença de parazitos é raramente verificada e não existem fenomenos de reprodução celular tendentes á separação das lezões.

Ao lado deste processo descrito, passa-se outro, mas este no tecido de sustentaculo da glandula.

Perifericamente aos canais, sem ser, comtudo, extenso a toda a glandula, ha aumento numerico de celulas conjuntivas e infiltração leucocitaria.

Esta reação pericanalicular afeta não somente tubos parazitados ou já em caminho de destruição, mas tambem tubos integros.

Convém assinalar, entretanto, que ha rejiões nestas glandulas, nas quais não foi verificado o menor esboço de reação, mesmo ao redor de canais vitimas do protozoario.

Algumas vezes o processo inflamatorio é bastante intenso nas cercanias de tubos muito lezados, rompe a membrana conjuntiva e leva a destruição ao que resta da parede tubular.

Aí forma-se então grande acumulo de celulas reacionarias, vendo-se, de permeio com ellas, celulas epiteliais em destruição, e parazitos, uns ainda no interior destas celulas, outros fagocitados por aquellas, e ainda outros, mais raros, completamente livres.

As celulas reacionarias destes fócos são, em sua maioria uninucleadas e com pequena camada de protoplasma.

No tecido conjuntivo encontram-se celulas de tamanho gigantesco, hospedeiras de parazitos, que, em seu interior, podem ser contados por centenas. Tais celulas possuem nucleo bastante grande, na maioria das vezes alterado, e tem protoplasma tomado pelos parazitos.

Na maioria dos cazos seu contorno é cercado por laminas conjuntivas, achando-se ellas em zonas inflamatorias.

Elemente seiner Wandung und wird auf eine einzige Schicht von — selbst in Degeneration begriffenen — Zellen reduziert. In diesem Stadium wird die Gegenwart der Parasiten selten konstatiert und es existieren keine Erscheinungen einer Zellreproduktion, welche zu einer Ausgleichung der Schädigung dienen könnte.

Neben dem beschriebenen Prozesse verläuft ein anderer im Stützgewebe der Drüse. Peripherisch von den Kanälchen, ohne sich jedoch auf die ganze Drüse zu erstrecken, existiert eine Vermehrung der Bindegewebszellen und eine Infiltration mit Leukozyten.

Diese perikanalikuläre Reaktion befällt nicht nur parasitenhaltige oder im Untergang begriffene, sondern auch normale Tubuli.

Es muss jedoch hervorgehoben werden, dass in diesen Drüsen Stellen vorkommen, wo nicht die geringste Andeutung einer Reaktion gefunden wird, selbst um Kanälchen, welche von den Protozoen befallen sind.

Manchmal ist der Entzündungsprozess um stark geschädigte Kanälchen ein sehr lebhafter, so dass er die Bindegewebsmembran zerreisst und den Rest der Kanälchenwand zerstört. Es bildet sich dann daselbst eine grosse Anhäufung reaktiver Zellen, zwischen denen man, im Untergang begriffene, Epithelien und Parasiten, teils im Innern jener Zellen und von ihnen aufgenommen, teils, aber selten, vollkommen frei erkennen kann. Die reaktiven Zellen solcher Herde sind der Mehrzahl nach einzellig und haben eine geringe Protoplasmaschicht.

Im Bindegewebe finden sich noch Zellen von riesiger Grösse mit Hunderten von Parasiten im Innern. Solche Zellen haben einen ziemlich grossen Kern, der meistens stark geschädigt ist und in seinem Protoplasma Parasiten enthält. Ihr Umriss ist meist von Bindegewebsschichten begrenzt und sie finden sich in entzündeten Gebieten. Ich halte sie für interstitielle Zellen; um diese Vermutung

Julgamol-as celulas intersticiais mas precizamos de pesquizas em animais propicios ao estudo da glandula intersticial do testiculo, para transformar este juizo em afirmativa (Est. 15, Fig. 3).

Os vazos, em grande numero, são passivos de lezões identicas ás que assinalámos em outros organs. Na albujinea não encontrámos fenomenos inflamatorios mas vimos celulas hipertrofidas e intensamente parazitadas (Est. 16, Fig. 2).

Epididimo: Em córtes deste orgam tivemos ensejo de verificar, na luz tubular, de mistura com espermatozoides, celulas parazitadas e semelhantes ás que acima mencionámos como destacadas das paredes dos canais seminiferos.

Ha aí outras celulas infestadas cuja orijem não nos é possivel ainda estabelecer; algumas tem volume bastante reduzido, em media diametral 15 a 20 *micra*; outras, porém, ultrapassam de muito esta média.

Vêm-se, algumas vezes, massas protoplasmaticas, sem nucleo vizivel, e com muitos esquizotripanos.

O estudo de córtes seriados mostra facilmente serem estas partes constitutivas das grandes celulas a que antes nos referimos.

Por vezes encontram-se protozoarios livres no liquido, mas este fato não é comum.

Quando faziamos as nossas pesquizas microscopicas, tivemos ocazião de observar duas formas redondas do esquizotripano parecendo incluidas no segmento cefalico de um espermatozoide (Est. 16, Fig. 3).

Esta celula mostra dois vacuolos correspondendo aos parazitos, alteração do nucleo e a modificação, não só morfolojica, mas tambem cromatica do « *Nebenkern* ».

Uma unica vez se nos deparou á observação, este fato, e, por isso, deixamos para estudo posterior a parazitação da referida celula.

zur Sicherheit zu gestalten, brauche ich aber Untersuchungen an Tieren, die für das Studium des interstitiellen Hodengewebes günstiger sind (Fig. 3, Taf. 15).

Zahlreiche Gefässe erleiden dieselben Veränderungen, die ich bei anderen Organen angegeben habe. In der albuginea fand ich keine Entzündungserscheinungen, dagegen hypertrophische und intensiv infizierte Zellen (Taf. 16, Fig. 2).

Epididymys: In Schnitten dieses Organes konstatierte ich im Lumen der Kanälchen unter den Spermatozoen ähnliche parasitenhaltige Zellen, wie ich sie eben als von der Mündung der Samenkanälchen abgelöst beschrieb.

Es kommen hier auch andere infizierte Zellen vor, deren Abstammung ich noch nicht feststellen konnte; einige sind sehr klein und messen im Mittel 15—20 Mikra; andere dagegen überschreiten diese mittlere Grösse weit.

Manchmal sieht man Protoplasmamassen ohne erkennbaren Kern, welche viele Schizotrypanen enthalten. Das Studium von Serienschnitten zeigt ohne weitere Schwierigkeiten, dass dies Fragmente der oben geschilderten grossen Zellen sind.

Manchmal findet man auch Protozoen in der Flüssigkeit, doch kömmt dies nicht häufig vor.

Während meiner Untersuchungen hatte ich Gelegenheit zwei runde Schizotrypanumformen zu beobachten, welche im Kopfteil eines Spermatozoons eingeschlossen schienen (Taf. 16, Fig. 3). Diese Zelle zeigt zwei Vacuolen, welche Parasiten entsprechen, Veränderung des Kernes, sowie eine, nicht nur morphologische, sondern auch chromatische Modifikation des Nebenkernes.

Dieses Faktum kam nur einmal zur Beobachtung und deshalb verspare ich die Infektion dieser Zellen für ein späteres Studium. Weitere Untersuchungen können jeden Zweifel zerstreuen, doch ist die Degeneration des Spermatozoons ein gewich-

Novas pesquizas poderão dissipar duvidas, si bem que a dejeneração sofrida pelo espermatozoide seja poderozo elemento para afirmar a sua parazitação.

ESPERMA. — Quando se sacrifica a cobaia por picada no bulbo ou no coração, não raro se dá a expulsão de algumas gotas de esperma que, neste cazo, é puro.

Colhemos assim o liquido em animais infetados, e o exame revelou, 2 vezes em 6, a prezença do esquizotripano.

Manguinhos, Julho de 1911.

tiger Grund, um seine Infektion zu behaupten.

SPERMA. — Wenn man Meerschweinchen durch Stich ins verlängerte Mark oder ins Herz tötet, so erfolgt nicht selten die Entleerung einiger Tropfen, in diesem Falle ganz reinen, Samens. Ich habe auf diese Weise die Flüssigkeit von infizierten Tieren gewonnen und die Untersuchung ergab in zwei von sechs Fällen die Gegenwart des Schizotrypanums.

Manguinhos, Juli 1911.

ESTAMPA 14.

Fig.

1. Corte lonjitudinal de musculo estriado de cobaia. Coloração VAN GIESON-CURTIS. Aumento = 1363 diametros.
   a) nucleos das celulas musculares.
   b) formas redondas de esquizotripanos.
   c) formas redondas de esquizotripano em divizão.
2. Corte transverso de fibra muscular estriada de cobaia, contendo esquizotripanos na parte central. Coloração VAN GIESON-CURTIS. Aumento = 1363 diametros.
   a) nucleo da fibra.
   b) forma redonda de esquizotripano.
   c) esquizotripano em divizão.
3. Corte transverso de fibra muscular estriada em um ponto onde já existe rutura da membrana. Coloração VAN GIESON-CURTIS. Aumento = 1363 diametros.
   a) nucleo da fibra.
   b) forma redonda de esquizotripano.
   c) esquizotripano em divizão.
   d) forma flajelada do parazito.
4. Neste corte ve-se destruição do elemento muscular e a prezença de varios parazitos flajelados. Coloração VAN GIESON-CURTIS. Aumento = 1363 diametros.
   a) nucleo da fibra.
   b) substancia hialina rezultante da destruição do elemento muscular.
   c) formas redondas de esquizotripano.
   d) forma flajelada de esquizotripano.

ESTAMPA 15.

Fig.

1. Corte de cerebro onde se vê uma celula de nevroglia contendo um cisto de formas redondas de esquizotripano. Coloração GIEMSA. Aumento = 1363 diametros.
   a) celula nervoza.
   b) celula de nevroglia.
   c) celula de nevroglia aumentada de volume e cheia de formas redondas de esquizotripano.
   d) nucleo da celula.
   e) formas redondas de esquizotripano.

TAFEL 14.

Fig.

1. Längsschnitt durch quergestreiften Meerschweinchenmuskel. Färbung nach VAN GIESON-CURTIS. Vergr. = 1363.
   a) Kerne des Muskelzellen.
   b) Runde Formen des Schizotrypanum.
   c) Dieselben in Teilung.
2. Querschnitt einer quergestreiften Muskelfaser, welche im Innern Schizotrypanum enthält. Färbung nach VAN GIESON-CURTIS. Vergr. = 1363.
   a) Kern der Faser.
   b) Runde Formen des Schizotrypanum.
   c) Schizotrypanum im Teilung.
3. Querschnitt der quergestreiften Muskelfaser an einer Stelle, wo bereits eine Ruptur vorliegt. Färbung nach VAN GIESON-CURTIS. Vergr. = 1363.
   a) Kern der Faser.
   b) Runde Formen des Schizotrypanum.
   c) Schizotrypanum im Teilung.
   d) Geisseltragende Form des Parasiten.
4. In diesem Schnitte sieht man die Zerstörung des Muskelelementes und verschieden geisseltragende Parasiten. Färbung nach VAN GIESON-CURTIS. Vergr. = 1363.
   a) Kern der Faser.
   b) Hyaline Substanz als Folgezustand der Zerstörung der Muskelfaser.
   c) Runde Formen des Schizotrypanum.
   d) Geisseltragende Formen des Schizotrypanum.

TAFEL 15.

Fig.

1. Hirnschnitt mit einer Neurogliazelle, welche eine von runden Formen des Schizotrypanum erfülte Zelle bildet. GIEMSA-färbung. Vergr. = 1363.
   a) Ganglienzelle.
   b) Neurogliazelle.
   c) Vergrösserte und von runden Formen des Schizotrypanum erfüllte Neurozelle.
   d) Zellkern.
   c) Runde Formen des Schizotrypanum.

Fig.

2. Corte de capsula suprarenal de cobaia — zona faciculada. Coloração VAN GIESON-CURTIS. A"mento=1363 diametros.
   a) celula da zona faciculada.
   b) celula intersticial.
   c) celula interfacicular.
   d) celula da zona faciculada contendo formas redondas do parazito.
   e) nucleo da celula parazitada.
   f) formas redondas de esquizotripano.
3. Celula intersticial hipertrofiada de testiculo de cobaia. Coloração VAN GIESON-CURTIS. Aumento=1200 diametros.
   a) nucleo da celula.
   b) laminas conjuntivas pericelulares.
   c) formas redondas de esquizotripano.
   d) esquizotripano com nucleo em divizão.
   e) elementos de reação.
4. Corte de cerebro onde ha um cisto de esquizotripanos no interior de uma celula de nevroglia, sendo a maioria constituida de elementos flajelados. Coloração GIEMSA. Aumento=1363 diametros.
   a) celula de nevroglia.
   b) capilar sanguineo com nucleo da celula endotelial.
   c) celula contendo esquizotripanos flajelados.
   d) nucleo da celula parazitada.
   e) formas redondas do parazito.
   f) formas flageladas de esquizotripano.

ESTAMPA 16.

Fig.

1. Corte obliquo de um tubo seminifero de cobaia colorido pelo metodo de GIEMSA. Aumento=1200 diametros.
   a) espermatozoides.
   b) celulas glandulares em cariocineze.
   c) celula epitelial, destacada da parede, contendo numerozas formas redondas de esquizotripano e com dejeneração nuclear muito pronunciada.
   d) esquizotripanos em divizão.
   e) celula da camada parietal cheia de esquizotripanos.
   f) parazitos no interior de celulas em via de destruição.
   g) parede do tubo vizinho.
   h) tecido intertubular.
2. Corte da albujinea de cobaia onde se ve uma grande celula, completamente cheia de esquizotripanos. Coloração GIEMSA. Aumento=1200 diametros.
   a) nucleo da celula.
   b) formas redondas de esquizotripano.
3. Espermatozoides do interior de um tubo epididimario, sendo um delles parazitado. Coloração GIEMSA. Aumento 1363=diametros.
   a) espermatozoides.
   b) segmento cefalico com duas formas redondas de esquizotripano, certamente em seu interior.

Fig.

2. Schnitt durch die Nebenniere eines Meerschweinchens. Fasciculäre Zone. Färbung nach VAN GIESON-CURTIS. Vergr.=1363.
   a) Zelle der fasciculären Zone.
   b) Interstitielle Zelle.
   c) Interfasciculäre Zelle.
   d) Zelle der fasciculären Zone, welche runde Parsitenformen einschliesst.
   e) Kern einer parasitenhaltigen Zelle.
   f) Runde Formen des Schizotrypanum.
3. Hypertrophische interstitielle Zelle aus dem Hoden eines Meerschweinchens. Färbung nach VAN GIESON-CURTIS. Vergr.=1200.
   a) Zellkern.
   b) Perizelluläre Bindegewebslamellen.
   c) Runde Schizotrypanumformen.
   d) Schizotrypanum mit in Teilung begriffenem Kerne.
   e) Entzündliche Elemente.
4. Hirnschnitt mit einer Schizotrypanumzyste im Innern einer Neurogliazelle, welche grösstenteils aus geisseltragenden Elementen besteht. GIEMSAfärbung. Vergr.=1363.
   a) Neurogliazelle.
   b) Blutkapillare mit dem Kern einer Endothelialzelle.
   c) Zelle mit geisseltragenden Schizotrypanumformen.
   d) Kern der parasitenhaltigen Zelle.
   e) Runde Formen der Parasiten.
   f) Geisseltragende Formen des Schizotrypanum.

TAFEL 16.

Fig.

1. Schrägschnitt durch ein Samenkanälchen vom Merschweinchen. Färbung nach GIEMSA. Vergr.=1200.
   a) Spermatozoen.
   b) Drüsenzellen in Karyokinese.
   c) Von der Wandung abgelöste Epithelialzelle, die im Innern zahlreiche runde Schizotrypanumformen enthälte. Sehr deutliche Kerndegeneration.
   d) Schizotrypanen in Teilung.
   e) Mit Schizotrypanen erfüllte Zelle aus der Parietalschicht.
   f) Parasiten aus dem Innern in Zerstörung befindlicher Zellen.
   g) Wandung des benachbarten Kanälchens.
   h) Intertubuläres Gewebe.
2. Schnitt durch die Albuginea vom Meerschweinchen. Man sieht eine grosse, von Schizotrypanen ganz erfüllte Zelle. GIEMSAfärbung. Vergr.=1200.
   a) Zellkern.
   b) Runde Schizotrypanumformen.
3. Spermatozoen im Innern eines Nebenhodenkanälchens; eines derselben enthält einen Parasiten. GIEMSAfärbung. Vergr.=1363.
   a) Spermatozoen.
   b) Kopfabschnitt eines solchen mit zwei, sicher in seinem Innern gelegenen, runden Schizotrypanumformen

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
TOMO III - 1911

ESTAMPA 14

a
a
c
b
c
1
2
d

C. LITH. HARTMANN-REICHENBACH S. PAULO RIO

Castro Silva. del.

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
TOMO III - 1911

ESTAMPA 14

2

3

1

4

LITH. HARTMANN REICHENBACH S. PAULO

CastroSilva del.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz
Tomo III - 1911
Estampa 15
a
b
c
d
e
f
1
2
3
4
Lith. Hartmann-Reichenbach S. Paulo Rio
Castro Silva del.

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
TOMO III - 1911
ESTAMPA 15
1
2
3
4
CastroSilva. del.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz
Tomo III - 1911
Estampa 16
a
b
c
d
e
f
g
h
1
2
3
C. Lith. Hartmann - Reichenbach S. Paulo Rio
Castro Silva del.

MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
TOMO III - 1911
ESTAMPA 16
3
2
1
CastroSilva del

Sobre a 'Contribuição para o Estudo da Anatomia Patológica da Moléstia de Carlos Chagas'

Zilton de Araújo Andrade
Laboratório de Patologia Experimental (Lapex)
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz

Em 1911 Gaspar Vianna publicou esse trabalho pioneiro sobre a anatomia patológica da doença descrita dois anos antes por Carlos Chagas. A publicação, bilíngüe (português e alemão), contém precisas descrições dos achados microscópicos sobre a então nova entidade mórbida, feitas a partir de material humano e experimental, que podem ser utilizadas e admiradas ainda hoje.

É evidente que a grande importância desse trabalho deve ser avaliada em uma perspectiva histórica. Sua leitura nos deixa entrever o entusiasmo com que a tarefa solicitada por Chagas era encarada e executada por todos seus associados. O jovem patologista Gaspar Vianna se viu confrontado com o estudo de um abundante e novo material, proveniente não só de inoculações em cobaias com o novo parasito (sobretudo em gatos, para o estudo das lesões que afetam o sistema nervoso central), como também de peças de necropsias realizadas em seres humanos, dez casos ao todo, que foram enviadas por Chagas. Podemos perceber que todo esse material foi sofregamente preparado e minuciosamente examinado em tempo relativamente curto, quando ainda existiam dúvidas e mesmo confusões a respeito das formas clínicas existentes. É bom lembrar que Chagas havia considerado o bócio endêmico como uma manifestação da nova doença parasitária, e investigava o envolvimento de um conjunto de outras glândulas numa forma pluriglandular da doença. E podemos perceber também o quanto esses detalhes influenciaram a atenção do patologista, que dedicou descrições extensas e minuciosas às alterações das glândulas, relatando em detalhes achados tais como áreas de espessamento fibroso em qualquer órgão, focos de hiperplasia ou de atrofia do tecido glandular, cistos de retenção no ovário, esteatose hepática etc., que hoje sabemos não terem relação direta com a doença em foco, mas cujo significado exato em relação a esta ainda não se conhecia na época. Por outro lado, a noção dominante no momento era de que a nova doença se apresentava como uma infecção generalizada, aguda, com parasitos se disseminando por vários órgãos, embora pudessem aparecer também várias formas crônicas. Além disso, a anatomia

patológica da época era uma disciplina essencialmente descritiva, e como a documentação iconográfica era difícil e laboriosa, as palavras deveriam fornecer uma descrição minuciosa e exata das alterações vistas nas necropsias ou ao microscópio. Interpretações fisiopatológicas e correlações anatomoclínicas eram ainda pouco usuais.

Mas, mesmo o autor tendo declarado modestamente que "Este trabalho abrangerá um conjunto de fatos histopatológicos já estabelecidos em casos humanos, com verificações em animais de laboratório", o seu arguto senso de observação o levou a algumas conclusões fundamentais, como podemos comprovar nas suas próprias palavras: "Pensamos atualmente que o músculo e o coração formam a pedra de toque para o diagnóstico histopatológico da moléstia de Chagas", ou "O coração é uma das vísceras de predileção do esquizotripano, quer no homem, quer nos animais".

Mas, o ponto alto da sua contribuição está representado por suas descrições da evolução dinâmica dos parasitos no interior das células do hospedeiro, ilustradas nas magníficas pranchas coloridas, que só encontrariam equivalente muitos anos mais tarde, com a microcinematografia de Hertha Meyer. Todos os detalhes, desde a penetração na célula hospedeira, a mudança para a forma amastigota, a multiplicação por divisão binária, a volta à forma infectante, a distensão, perfuração ou ruptura da célula parasitada até a reação focal pelas células do hospedeiro, aparecem descritos com precisão impressionante.

É, portanto, é com toda justiça que o trabalho de Gaspar Vianna aparece hoje destacado como um marco no nosso conhecimento sobre a patologia da doença de Chagas.

Cezar Guerreiro & Astrogildo Machado

Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico: nota preliminar.

Brasil Médico, (23): 225-226, 1913.

Cezar Guerreiro (1885-1949)

Patologista paraense e pesquisador do Instituto de Manguinhos, contribuiu para o avanço na detecção da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica, a partir do desenvolvimento de um método de diagnóstico indireto da doença de Chagas, conhecido por Guerreiro e Machado.

Astrogildo Machado (1885-1945)

Pesquisador paulista, trabalhou em parceria com Cezar Guerreiro no desenvolvimento da reação Guerreiro e Machado. Dedicou-se ainda a pesquisas no campo da química e da imunologia, gerando importantes aperfeiçoamentos na técnica de preparo de soros.

Anno XXVII 15 de Junho de 1913 N. 23

Brazil-Medico

SUMMARIO

Trabalhos do Instituto Oswaldo Cruz

Revisão do cyclo evolutivo do «Trypanozoma Cruzi»

PELO DR. CARLOS CHAGAS

(Chefe de serviço no Instituto Oswaldo Cruz)

Estudando o cyclo evolutivo do *Trypanozoma* CRUZI, agente da nova doença humana, observámos com muita constancia, nas cobayas infectadas, fórmas parasitarias no pulmão, que julgámos dever considerar, após demoradas verificações, como estadio da evolução daquelle parasito humano. E' certo que alguns factos, em nossas pesquizas, pareciam contradizer aquella conclusão e nos deixaram no espirito um ponto de duvida. Foi quando realizámos a primeira autopsia de um caso agudo de trypanozomiase humana e, em esfregaços do pulmão, encontrámos fórmas parasitarias inteiramente identicas ás da cobaya. Isso nos pareceu então constituir facto decisivo para considerar aquellas fórmas parasitarias do pulmão como fazendo parte do cyclo do *Schizotrypanum* CRUZI. Mais tarde, porém, o Dr. HENRIQUE ARAGÃO, assistente do Instituto, fazendo estudos em coelhos, observou no pulmão destes animaes fórmas parasitarias identicas áquellas das cobayas infectadas pelo *Sshizotrypanum*. O Dr. ARAGÃO póde ainda fazer identicas verificações em coelhos e cobayas normaes, sendo o facto confirmado pelas pesquizas dos Drs. CEZAR GUERREIRO e ASTROGILDO MACHADO, em cobayas e outros animaes, sem duvida, livres de infecção pelo *Schizotrypanum*. Assim, em preás, cabritos e carneiros, a mesma verificação foi realizada.

Deste modo, e apezar da nossa verificação no pulmão de um caso humano de trypanozomiase, somos levado a acreditar que as fórmas de protozoarios referidas representam um outro parasito e não fazem parte do cyclo do *Schizotrypanum* CRUZI.

Como explicar a presença de taes parasitos no pulmão humano?

Será o homem, como muitos animaes domesticos, passivel de ser parasitado por aquelle protozoario?

Essa hypothese não nos parece impossivel, dada a frequencia do parasito em diversas especies animaes. Ou teria havido, em nossas pesquizas, sem que possamos comprehendel-a, troca de laminas no momento das fixações e colorações do material humano? Nada nos auctorisa a essa conclusão, que registamos, entretanto, como possivel.

Cumpre ainda referir que o Dr. CARINI, do Instituto Pasteur de S. Paulo, observou em ratos parasitados pelo *Trypanozoma* LEWISI as mesmas fórmas parasitarias, e que M. e Mme. PIERRE DELANOE, depois de haverem confirmado a observação de CARINI, puderam encontrar o mesmo protozoario em ratos novos, livres de infecção pelo *Trypanozoma* LEWISI.

Os ultimos auctores crearam, então, para o parasito o genero *Pneumocystis*, denominando-o *Pneumocystis* CARINII.

A verificação da phase evolutiva do parasito, no pulmão de cobayas, constituia um dos elementos para o diagnostico experimental da trypanozomiase brazileira. Para substituir aquelle elemento, outro foi agora estabelecido, graças ás pesquizas dos Drs. CEZAR GUERREIRO e ASTROGILDO MACHADO, pelo processo de BORDET e GENGOU.

Manguinhos, 3 de Junho de 1913.

Da reacção de Bordet e Gengou na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnostico

PELOS DRS.

CEZAR GUERREIRO e ASTROGILDO MACHADO

(*Nota preliminar*)

Para confirmação do diagnostico clinico da trypanozomiase brazileira, recorria-se até agora tão sómente á inoculação de sangue do doente em animaes receptiveis, cobayas de preferencia, e, aguardada a morte delles, á pesquiza da phase schizogonica no pulmão.

Mas, uma vez admittido o facto desta fórma parasitaria, como se infere da nota publicada pelo Dr. CARLOS CHAGAS, não pertencer ao cyclo evolutivo do *Schizotrypanum* CRUZI, tal elemento de diagnostico não poderia mais ser levado em conta.

Com o intuito de obter um elemento seguro confirmativo daquillo que a clinica fornece, fomos encarregados pelo Dr. OSWALDO CRUZ de verificar, si usando de antigenos proprios, era possivel, nos sôros de animaes infectados, uma fixação de complemento, para dahi deduzir da sua utilisação, como elemento de diagnostico.

Como antigeno, nesses ensaios preliminares, empregamos corpos de trypanozomas, assim obtidos: Um pequeno cão, apresentando uma infecção não muito forte pelo *Trypanozoma* CRUZI, foi sangrado no coração e, por este modo, retirados 50 c. c. de sangue, que fôram misturados á igual quantidade de solução esteril de citrato de sodio a 2 %, com o fim de evitar

a coagulação. Esta mistura foi centrifugada durante 5 minutos em fraca velocidade e, então, com o maximo cuidado, retirado o liquido superjacente ao deposito, até a camada esbranquiçada que cobria os globulos. Este liquido foi novamente centrifugado em grande velocidade, dando no fundo do tubo um deposito esbranquiçado, rico em corpos de trypanozomas, o que se verificou ao microscopio; lavado esse deposito tres vezes com solução physiologica, foi então diluido até o liquido ficar fracamente opalescente.

Assim preparado, este antigeno não tem acção anti-complementar até a dose de 0,6 c. c.

Com os sôros de 3 cães infectados, praticámos a reacção, conseguindo em todos elles um resultado positivo, impedimento quasi completo da hemolyse, exprimindo, talvez, este facto o ter sido empregado, com o fim de preparar o antigeno, o sangue de um animal que não apresentava uma infecção abundante.

Praticada a reacção em sôros de doentes que já haviam apresentado trypanozomas na peripheria, e, por tal, certamente, portadores da trypanozomiase brazileira, tambem obtivemos resultados positivos.

Como o preparo deste antigeno exige grande cuidado, e não sendo possivel, por meio delle, obter grandes quantidades, lançámos mão dos extractos de baço de cães novos, por ser elle o orgam onde existe o parasito em maior quantidade.

Para esse fim, recolhiamos o baço, grandemente augmentado de volume, de cães novos infectados, verificando préviamente a intensidade da infecção, e trituravamos em um gral com 3 partes, em peso, de agua destillada phenicada a 1 %, deixando essa mistura na temperatura do ambiente, ao abrigo da luz, agitando-a frequentes vezes. Este producto era filtrado n'uma gaze e depois addicionado a igual volume da solução de chlorureto de sodio a 17 %, para assim ficar o titulo da solução definitiva com 0,85 de chlorureto de sodio e 0,5 de acido phenico. Após dous dias, era novamente filtrado em papel. Antes de ser empregado, verificavamos o seu poder anti-complementar.

Tambem foi empregado o extracto glycerinado, assim preparado: A' quantidade conhecida de polpa esplenica, ajuntavamos 2 partes, em peso, de glycerina de PRICE, trituravamos, deixando a mistura por 2 a 3 dias em temperatura do ambiente, agitando-a constantemente; filtrada, depois, em gaze e o filtrado, tratado pelo alcool absoluto, o que produzia precipitação muito abundante, nova filtração era feita, então, em papel, e, sobre esse mesmo filtro, era o precipitado retido lavado mais uma vez com alcool absoluto. Depois de secco, era este precipitado emulsionado na proporção de 2 % com agua physiologica a 0,85 % e acido phenico 0,5 %.

Conserva-se este producto na geleira 6 a 8 dias, e o liquido claro, que sobrenada, é então utilisado como antigeno. Com este processo tinhamos em vista, pelas lavagens repetidas com alcool absoluto, retirar os lipoides, que poderiam falsear a reacção.

Preparamos tambem extractos alcoolicos de figado e baço de animaes muito infectados; elles, porém, ao lado da fixação do complemento em presença de sôros de animaes infectados e de doentes de trypanozomiase, tambem fixavam os anti-corpos syphiliticos. Os extractos aquoso, glycerinado ou de corpos de trypanozomas não fixam esses mesmos anti-corpos, préviamente demonstrados.

Para excluir a syphilis, ao lado da reacção alludida, praticámos a reacção de WASSERMANN, que era, em absoluto, independente dos resultados da primeira.

As combinações de sôro e antigeno fôram feitas nas mesmas proporções da reacção de WASSERMANN, isto é, a 0,2 e 0,1 de sôro ou antigeno.

Praticámos 102 ensaios com sôros de doentes de diversas fórmas da molestia, obtendo 68 resultados positivos, ou 66,6 %.

Com o sôro de casos cuja reacção fôra negativa, praticamol-a novamente, augmentando para 0,3 c. c. de sôro e antigeno, conseguindo um resultado positivo, de modo que a percentagem acima representa, talvez, o coefficiente minimo.

De todos os antigenos empregados, o extracto aquoso de baço foi o que nos forneceu melhores resultados.

De agora em diante, utilisaremos o sôro e antigeno na dose maxima de 0,3 c. c. e praticaremos de antemão a absorpção dos amboseptores hemolyticos normaes do sôro humano.

Um de nós (MACHADO) occupar-se-á da verificação com o antigeno preparado com baço de animaes inoculados com *Trypanozoma* CRUZI e o outro (GUERREIRO) procurará vêr, preparando antigeno com outras especies de trypanozomas e leishmanias, si fôr possivel, si a reacção constitue um phenomeno de grupo, o que não diminuirá em nada o valor diagnostico della, attendendo ser a molestia de CARLOS CHAGAS a unica trypanozomiase humana observada na America do Sul.

Manguinhos, 4 de Junho de 1913.

CLINICA DAS VIAS URINARIAS

Divagações sobre vias urinarias

PELO DR. NUNO INFANTE

Haverá vantagem no emprego do dilatador lavador de KOLLMANN, em substituição ao dilatador simples do mesmo autor?

Eis um assumpto que ha muito nos preoccupa e muito nos tem interessado. A observação vem nos demonstrando ter o dilatador de quatro ramos uma acção especial sobre a mucosa urethral, já bem conhecida de todos, mas, infelizmente, ainda para nós insufficientemente interpretada.

Não é uma acção mechanica, assim como não nos parece ser uma acção dynamica; o facto é que as infiltrações duras entram em franco periodo de reabsorpção, chegando a um certo grão onde a investigação urethroscopica nos demonstra a existencia de uma urethra apresentando caracteres inteiramente diversos; vamos encontrar a presença de uma mucosa

Contribuição da Reação de Guerreiro e Machado para o Diagnóstico da Doença de Chagas

Yara de Miranda Gomes
Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

Samuel Goldenberg
Instituto Carlos Chagas/Fiocruz

A reação de Guerreiro-Machado, também conhecida como teste de Machado-Guerreiro ou reação de Machado-Guerreiro, foi desenvolvida em 1913, quatro anos após a descoberta da doença de Chagas. Foi a primeira descrição de pesquisa de anticorpos anti-*Trypanossoma cruzi* no soro de indivíduos chagásicos a adotar uma abordagem imunológica, a Reação de Fixação do Complemento (RFC), procedimento desenvolvido por Bordet e Gengou (1901) e empregado no diagnóstico da sífilis em 1906 (Wasserman, Neisser & Bruck, 1906). Podemos considerar a descrição da RFC para diagnosticar a doença de Chagas em sua fase crônica um fato relevante, uma vez que naquela época a confirmação do diagnóstico clínico era obtida por meio de teste parasitológico, inoculando-se o sangue do doente em cobaias. O resultado desse teste só era obtido após a morte do animal, quando se realizava a pesquisa de formas esquizogônicas no pulmão. No entanto, constatou-se que essas formas não pertenciam ao ciclo evolutivo do *T. cruzi*, e sim ao do *Pneumocysttis carini* (Chagas, 1913), o que mostrou que o método não era seguro, razão pela qual foi abandonado.

No artigo de Guerreiro e Machado, de 1913, observa-se a preocupação com a obtenção de um diagnóstico seguro, bem como o cuidado com os procedimentos metodológicos. Nesse trabalho se fazem notar a genialidade e o conhecimento científico de Oswaldo Cruz, que os encarregou de verificar se, usando-se antígenos próprios (*T. cruzi* por eles obtidos), seria possível uma fixação do complemento no soro dos indivíduos infectados, para em seguida se avaliar o seu emprego no diagnóstico. A liderança científica de Oswaldo Cruz levou Guerreiro e Machado a obter antígenos do sangue, baço e fígado de cães infectados por meio de diferentes procedimentos que resultaram em extrato parasitário aquoso, glicerinado e alcoólico. Avaliando-se o desempenho desses antígenos na RFC, o extrato aquoso do baço

foi o que revelou os melhores resultados. O problema de reação cruzada também foi uma preocupação de Guerreiro e Machado, que para excluir a sífilis realizaram a reação de Wasserman. É importante ressaltar o pioneirismo de uma metodologia que era baseada na observação não do patógeno, mas da reação do hospedeiro a este, com o isolamento de moléculas para utilização em uma reação bioquímica. Considerando-se a época, início do século XX, podemos considerar esse teste uma inovação tecnológica e um salto qualitativo importante no diagnóstico da "doença de Carlos Chagas", como denominada por Guerreiro e Machado.

O trabalho em equipe e o planejamento para as etapas de avaliação da RFC em indivíduos chagásicos são exemplo de condução de um trabalho científico: Machado se ocupou de verificar o desempenho do antígeno preparado com o baço de animais infectados com *T. cruzi* e Guerreiro, de preparar antígenos com outras espécies de tripanossomas e leishmanias.

A reação de Guerreiro-Machado foi submetida a várias modificações e padronizações ao longo do tempo (Almeida & Fife 1976; Almeida *et al.*, 1980; Almeida, 1984; Almeida & Cunha, 1981), conseqüência do próprio avanço das técnicas de cromatografia e purificação de antígenos, e utilizada em vários inquéritos epidemiológicos (Huggins *et al.*, 1969; Baldy *et al.*, 1978). A longevidade dessa técnica, o único teste disponível durante mais de cinqüenta anos e utilizado em rotina para o diagnóstico da doença de Chagas (Luquetti, 2008), é algo a ser destacado. No entanto, como esse teste utiliza proteínas do sistema complemento que são extremamente termolábeis, esse reagente acabou se tornando inadequado para a reação, e além disso sua baixa sensibilidade e reprodutibilidade não satisfazem aos padrões exigidos atualmente (MS/SVA, 2005).

A reação de Guerreiro-Machado foi um marco importante no diagnóstico da doença de Chagas, e sua aplicação gerou resultados de importante impacto na saúde pública no século XX.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. O. Estudos sobre a reação de Guerreiro-Machado: análise cromatográfica de antígenos de *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(3): 363-367, 1984.

ALMEIDA, J. O. & CUNHA, T. A. Estudos sobre a reação de Guerreiro-Machado: efeitos da inativação do soro chagásico na fixação do complemento com antígenos de *Trypanosma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 76(3): 269-277, 1981.

ALMEIDA, J. O. & FIFE, E. H. JR. Quantitatively standardized complement-fixation methods for critical evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*. Washington: Pan American Health Organization, 1976. (Scientific Publication, 319)

ALMEIDA, J. W. R. *et al.* Comportamento evolutivo da reação de fixação do complemento quantitativa na fase crônica da doença de Chagas, sem influência do tratamento específico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 22(2): 78-81, 1980.

BALDY, J. L. S *et al.* Prevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi*, em 1975, em dois bancos de sangue de Londrina, Paraná, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 12: 409-416, 1978.

BORDET, J. J. B. V. & GENGOU, O. Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. *Annales de l'Institut Pasteur*, 15: 289-302, 1901.

CHAGAS, C. Revisão do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Brasil Médico*, 27(23): 225, 1913.

HUGGINS, D. *et al.* Inquérito sorológico para o diagnóstico da doença de Chagas entre doadores de um banco de sangue no Recife. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, IV(2): 105-112, 1969.

LUQUETTI, A. O. História dos métodos de diagnóstico para a doença de Chagas. Disponível em: <www.fiocruz.br/chagas>. Acesso em: 12 abr. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30, supl. III: 12-14, 2005.

WASSERMAN, A. P.; NEISSER, A. & BRUCK, C. Eline serodiagnostiche Reaktion bei Syphilis. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 32: 745-746, 1906.

ÉMILE BRUMPT

O xenodiagnóstico: aplicação ao diagnóstico de
algumas infecções parasitárias e em
particular a tripanossomose de Chagas.
Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia, 3(5): 97-102, 1914.

Émile Brumpt (1877-1951)

Parasitologista francês, descobriu o parasito responsável pela malária aviária, *Plasmodium gallinaceum*. Desenvolveu a técnica do xenodiagnóstico para as doenças parasitárias e realizou estudos importantes sobre malária, doença de Chagas, doença do sono, leishmanioses, oncocercose e esquistossomose urinária.

ANNO II S. PAULO — NOVEMBRO DE 1914 VOL. III — N.o 5

Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia

ASSIGNATURAS: 15$000 por anno
= NUMERO AVULSO 1$500 =
PUBLICAÇÃO MENSAL

Redacção e Administração:
RUA JOSÉ BONIFACIO N. 40 (sb.)
S. PAULO — BRASIL

O XENODIAGNOSTICO

APPLICAÇÃO AO DIAGNOSTICO DE ALGUMAS INFECÇÕES PARASITARIAS E EM PARTICULAR Á TRYPANOSOMOSE DE CHAGAS

POR

E. BRUMPT

Professor de Parasitologia da Faculdade de Medicina de São Paulo

(Trabalho do Laboratorio de Parasitologia da mesma Faculdade)

LE XENODIAGNOSTIC

APPLICATION AU DIAGNOSTIC DE QUELQUES INFECTIONS PARASITAIRES ET EN PARTICULIER Á LA TRYPANASOMOSE CHAGAS

PAR

E. BRUMPT

Professeur de Parasitologie de la Faculté de Médicine de São Paulo

(Travail du Laboratoire de Parasitologie de la même Faculté)

Dou o nome de Xenodiagnostico (de ξενος, hospede) ao diagnostico que proponho fazer por meio do hospede, agente vector da molestia parasitaria, ou, por meio de um hospede vicariante que possa garantir a cultura e evolução do parasita. E' em summa uma cultura natural do parasita nos hospedes favoraveis.

O diagnostico das molestias parasitarias do sangue é ás vezes muito delicado. Nas trypanosomoses em particular, não só no homem como nos animaes os mais diversos, sabe-se como é difficil por vezes verificar a

Je donne le nom de Xenodiagnostic (de ξενος, hôte) au diagnostic que je propose de faire au moyen de l'hôte agent vecteur habituel de la maladie parasitaire, ou, à l'aide d'un hôte vicariant pouvant assurer la culture et l'évolution du parasite. C'est en somme une culture naturelle du parasite chez des hôtes favorables.

Le diagnostic des maladies parasitaires du sang est parfois très délicat. Dans les trypanosomoses en particulier, aussi bien chez l'homme que chez les animaux les plus divers, on sait combien il est parfois difficile

existencia dos trypanosomas, pelo exame directo. Pode-se então empregar para o diagnostico a centrifugação, a inoculação nos animaes sensiveis ou a cultura em certos meios. Infelizmente em bastantes casos, estes meios se não podem utilisar ou dão resultados negativos.

Desde 1904, ao estudar a evolução dos trypanosomas dos peixes, chamou-me attenção o apparecimento de culturas abundantes de trypanosomas no estomago de sanguesugas novas que sugaram peixes indemnes, pelo exame directo, de trypanosomas ou tendo mostrado sómente trypanoplasmas.

Tive occasião, bem a miudo, depois dáquella epocha, de verificar factos semelhantes. Appliquei este processo de diagnostico pelas sanguesugas novas (1) ao estudo dos trypanosomas dos batrachios e das serpentes do Brasil.

As sanguesugas estudadas no Brasil pertenciam a duas especies. A primeira é uma especie brasileira, *Placobdella brasiliensis* — Brumpt, 1914 — commum nas rans do Brasil e hospede transmissor do *Trypanosoma leptodactyli,* Carini — como pude demonstrar. (2) No decurso de trabalhos feitos no Instituto de Vital Brasil, de Butantan, appliquei o xenodiagnostico ao estudo dos trypanosomas das serpentes.

Consegui primeiramente demonstrar que os trypanosomas — *Trypanosoma Brasili,* Brumpt, 1914 — d'uma serpente aquatica —

(1) Utilisam-se estas sanguesugas ou logo depois de nascidas, quando fique provado que nunca apresentem infecção hereditaria ou depois de varios repastos em animaes não infestados. Este ultimo processo permitte terem-se sanguesugas mais edosas e volumosas, que sugam maior quantidade de sangue.

(2) O *Trypanosoma leptodactyli* de Carini é a forma joven dum grande trypanosoma do *Leptodactylus ocellatus.* Não tenho terminada a memoria com figuras que devo publicar sobre sua evolução. Resumo no entanto sua historia dizendo que a forma sanguicola se apresenta em bola, perde seu flagello e se divide primeiramente em dois no estomago da sanguesuga; em seguida, depois de uma evolução normal dá Trypanosomas metacyclicos que passam para a bainha da tromba e são inoculados ás rans.

de déceler l'existence de trypanosomes par l'examen direct. On peut alors employer, pour faire le diagnostic, la centrifugation, l'inoculation aux animaux sensibles ou la culture sur certains milieux. Malheureusement, dans bien des cas, ces moyens ne sont pas utilisables ou donnent des résultats négatifs.

Dès 1904, en étudiant l'évolution des trypanosomes des Poissons, j'avais été frappé de l'apparition de cultures abondantes de trypanosomes dans l'estomac de sangsues neuves ayant sucé des Poissons indemnes de Trypanosomes à l'examen direct, ou, ayant montré seulement des Trypanoplasmes.

J'ai eu bien souvent l'occasion, depuis cette époque, de verifier des faits semblables. J'ai appliqué ce procedé de diagnostic, par les sangsues neuves (1), á l'étude des trypanosomes des Batraciens et des serpents du Brésil.

Les sangsues étudiées au Brésil appartenaient à deux espèces. La première est une espèce brésilienne — la *Placobdella brasiliensis* — Brumpt 1914, commune sur les Grenouilles du Brésil et hôte transmetteur du *Trypanosoma leptodactyli,* Carini—, ainsi que j'ai pu le démontrer (2). La seconde est la *Placobdella catenigera* de la France Meridionale dont je poursuis l'élevage de puis 1906.

En faisant piquer des Grenouilles considerées comme non infectées aprés un ou plusieurs examens négatifs par des sangsues neuves, j'ai eu des cultures abondantes chez ces dernières. Le fait est facile á expliquer

(1) Les sangsues sont utilisées soit dès leur naissance, quand il est démontré qu'elles ne présentent jamais d'infection héréditaire, soit après plusieurs repas sur des animaux non infectés. Ce dernier procédé permet d'avoir des sangsues agées plus volumineuses et suçant une plus grande quantité de sang.

(2) Le *Trypanosoma leptodactyli* de Carini est la forme jeune d'un grand Trypanosome du *Leptodactylus ocellatus.* Le mémoire avec figures que je dois publier sur son évolution n'est pas terminé. Je résume son histoire en disant que la forme sanguicole se met en boulet perd son flagelle et se divise d'abord en deux dans l'estomac de la sangsue, puis aprés une évolution normale donne des Trypanosomas metacycliques. Ceux-ci passent dans la gaine de la trompe et sont inoculés aux Grenouilles.

Helicops modestus — evoluiam facilmente e rapidamente na *Placobdella brasiliensis.*

Contava eu dar uma descripção completa da *Placobdella brasiliensis*, n. sp., na memoria que esperava publicar sobre a evolução do *Trypanosoma leptodactyli*, porém minha brusca partida para a guerra franco-alleman fez fracassar meus projectos. Contento-me pois em dizer que esta sanguesuga, de côr verde azeitona carregada, apresenta pequenas manchas amarellas, pode attingir a 6 centimetros de comprimento e apresenta uma consistencia molle como a *Hemiclepsis tesselata*, nadando bem e podendo ir á cata de sua presa. A criação délla é facil; obtive, com um pouco de paciencia, milhares de exemplares que me serviram e me hão de servir para numerosas experiencias.

Esta sanguesuga alimenta-se facilmente de rans de diversas especies, de crocodilos, serpentes, tartarugas, mas recusa picar certos sapos e peixes. Ao cabo do sexto repasto o animal torna-se adulto; na copula, os animaes applicam-se um ao outro, spermatophoros; a fecundação effectua-se, como habitualmente, pela via hypodermica. A postura se faz sob o ventre; os ovos amarellos, contidos em casulos hyalinos, apegam-se uns aos outros.

Um animal pode pôr, conforme o seu tamanho, de trinta a cem e mais ovos.

O *Trypanosoma Brasili* muito se parece com o *Trypanosoma leptodactyli* adulto; evolue rapidamente no estomago da *Placobdella brasiliensis* e dá, em algumas semanas, formas metacyclicas extremamente numerosas. Estas formas metacyclicas não passam para a bainha da tromba, mesmo depois de varios mezes, e é provavel que a serpente se infeste ingerindo as sanguesugas parasitadas.

A evolução deste Trypanosoma se faz tambem na *Placobdella catenigira.*

Ao estudar a evolução, na *Placobdella brasiliensis*, d'uma Hemogregarina de outra serpente — *Radinia Merremii* — surprehendeu-me achar em abundancia, no estomago das sauguesugas, flagellados e finalmente Trypanosomas metacyclicos.

par l'excellence de l'hôte transmetteur chez lequel l'évolution se fait dans 100 pour cent des cas et d'autre part par la quantité de sang ingérée qui est de 10 a 500 fois plus grande que la goutte de sang susceptible d'etre examinée au microscope.

Au cours des travaux faits à l'Institut de Vital Brasil à Butantan (São Paulo) j'ai appliqué ce Xenodiagnostic à l'ètude des Trypanosomes des Serpents. J'ai d'abord pu démontrer que les trypanosomes, *Trypanosoma Brasili*, Brumpt 1914 — d'un serpent aquatique l'*Helicops modestus* évoluait facilement et rapidement chez la *Placobdella brasiliensis.*

J'espérais donner une description complète de la *Placobdella brasiliensis* n. sp. dans le mémoire que je comptais publier sur l'évolution du *Trypanosoma leptodactyli;* mon brusque départ pour la guerre franco-allemande a changé mes projets. — Je me contente de dire que cette sangsue de couleur vert olive foncé présente de petites taches jaunes; elle peut atteindre 6 centimètres de longueur et présente une consistance molle comme l'*Hemiclepsis tesselata,* elle nage bien et peut aller à la recherche de sa proie. L'élevage en est facile; avec un peu de patience, j'en ai obtenu des milliers d'exemplaires qui m'ont servi et serviront pour de nombreuses expériences.

Cette sangsue se nourrit facilement sur des Grenouilles d'especès diverses, sur les Crocodiles, Serpents, Tortues, mais refuse de piquer certains Crapauds et les Poissons.

Au bout du sixiemè repas l'animal devient adulte; en s'accouplant les animaux deposent des spermatophores; la fécondation est comme d'habitude, effectué par la voie hypodermique. La ponte s'effectue sous le ventre; les œufs jaunes contenus dans des cocons hyalins sont accolés les uns aux autres. Un animal peut pondre, suivant sa taille, de trente à cent et quelques œufs.

Le *Trypanosoma Brasili,* ressemble beaucoup au Trypanosoma leptodactyli adulte; il évolue rapidement dans l'stomac de la *Placobdella brasiliensis* et donne, en quelques semaines, des formes métacycliques extrémement nombreuses. Ces formes métacycliques ne passent pas dans la gaine de la trompe, même après plusieurs mois, et il est probable que le serpent s'infecte en engérant les sangsues parasitées. L'evolution de ce Trypanosomes s'effectue aussi chez *Placobdella catenigera.*

En étudiant l'évolution, chez *Placobdella brasiliensis*, d'une Hémogregarine d'un autre serpent vivant volontiers dans l'eau, le *Radinia Merrimii*, j'ai été surpris de trouver en

Foi sómente em um quinto exame a fresco que pude encontrar no sangue da serpente o Trypanosoma cuja existencia me era assignalada pelo Xenodiagnostico.

O Trypanosoma de *Radinia Merremii* parece-se muito com o *Trypanosoma Brasili.* A falta de animaes novos impedio-me de estabelecer a identidade e differenciação delles.

Em uma cobaya infestada com o Trypanosoma Cruzi (virus da Bahia), e não tendo Trypanosomas pelo exame directo, a existencia do parasita poude ser demonstrada, fazendo picar este animal por larvas, no terceiro estadio, do *Triatoma* (*Conorhinus*) *megista.*

Fazendo nymphas de *T. megista* picar tres crianças atacadas da molestia de Chagas, antiga, só tive resultados negativos, identicos aliás aos obtidos por outros meios de diagnostico.

Em casos recentes da Molestia de Chagas a infecção certamente se faria. Os Triatomas são capazes, com effeito, de garantir em qualquer edade, a cultura do *Trypanosoma Cruzi,* e, como podem absorver de 10 a 500 vezes mais sangue que a quantidade que se pode pôr entre lamina e laminula, apresentam elles vantagens consideraveis sobre o exame directo.

Os triatomas são mais vantajosos que as Cobayas cujos leucocytos podem destruir alguns raros Trypanosomas inoculados com o sangue de um doente.

Para o diagnostico da molestia de Chagas, pois, julgo ser conveniente tentar o Xenodiagnostico com larvas ou nymphas de Triatomas, todas as vezes que os outros meios não sejam applicaveis ou se mostrem negativos.

A criação dos Triãtomas necessarios para o Xenodiagnostico da molestia de Chagas é das mais simples.

Partindo de ovos, obtem-se larvas indemnes de parasitas, as quaes podem ser alimentadas em animaes sãos ou refractarios á infecção pelo *Trypanosoma Cruzi,* como gallinhas e pombos.

abondance dans l'estomac des sangsues des flagelles et facilement des Trypanosomes métacycliques. C'est seulement à un cinquième examen à frais que j'ai pu trouver dans le sang du serpent le Trypanosome dont l'existence m'était signalée par le Xenodiagnostic.

Le Trypanosome de *Radinia Merremii* ressemble beaucoup au *Trypanosoma Brasili.* Le manque d'animaux neufs m'a empêché d'établir leur identité ou de les différencier.

Chez un Cobaye infecté avec le Trypanosoma Cruzi (virus de Bahia) et n'ayant pas de Trypanosomes à l'examen direcct, l'existance de parasite a pu être démontrée en faisant piquer cet animal par des larves au troisiéme stade de *Triatoma (Conorhinus) megista.*

En faisant piquer trois enfants atteints de maladie de Chagas ancienne par des nymphes de *Triatoma megista,* je n'ai obtenu que des résultats négatifs, ainsi d'ailleurs que ceux obtenus par les autres moyens de diagnostic. Dans des cas de maladie de Chagas, recents, il est certain que l'infection se serait produite. Les Triatomes sont en effet capables d'assurer la culture du *Trypanosoma Cruzi* à tout âge, et, comme ils peuvent absorber de 10 a 500 fois plus de sang qu'il n'est possible d'en mettre entre lame et lamelle ils présentent un avantage considérable sur l'examen direct. Les Triatomes sont également plus avantageux que les Cobayes dont les leucocytes peuvent détruire les quelques rares Trypanosomes inoculés avec le sang d'un malade.

Donc pour le diagnostic de la maladie de Chagas, je crois qu'il est bon de tenter le Xenodiagnostic avec des larves ou des nymphes de Triatomes, chaque fois que les autres moyens ne sont pas applicables ou seront négatifs.

L'élevage des Triatomes nécessaires pour le Xenodiagnostic de la maladie de Chagas est des plus simples. En partant de œuf, l'on obtient des larves indemnes de parasites que l'on peut nourrir sur des animaux sains ou réfractaires à l'infection par le *Trypanosoma Cruzi,* comme les Poules et les Pigeons.

Nas experiencias de infestação que fiz com diversas especies de Triatomas (*T. infestans*, *T. megista*) ou de Rhodnius (*R. prolixus*) obtive sempre resultados positivos de cento por cento. Esta porcentagem distingue estes maravilhosos hospedes vectores das Glossinas que, na molestia do somno e em outras trypanosomoses animaes se infestam em proporção minima.

Creio que o Xenodiagnostico, no estudo systematico e geographico da molestia de Chagas no homem e nos animaes domesticos ou selvagens do Brasil, poderá prestar os maiores serviços.

De facto, nas regiões do interior do Brasil habitadas, por gente muito hospitaleira mas pouco familiarisada com os processos medicos, é difficil, no decurso de um inquerito, fazer frottis de sangue pela picada dos dedos das crianças. Estes frottis são além disso inutilisaveis geralmente pela raridade e fragilidade do *Trypanosoma Cruzi*. O exame directo do sangue com o microscopio é difficil, pois que o transporte d'um microscopio, a cavallo, apresenta muitos inconvenientes e o exame entre lamina e laminula faz perder um tempo precioso.

Melhor e mais facil em theoria seria tirar alguns centimetros cubicos de sangue ao doente e inoculal-o a uma cobaya. Esta puncção, porém, seria bem raramente acceita, e, poderia, pela falta de assistencia local util, apresentar perigos grandes no correr de uma expedição.

E' em face d'estas difficuldades de ordem material que proponho o emprego anodino do Xenodiagnostico.

Todos os doentes conhecem os Triatomas e podem consentir a se deixarem picar por estes insectos cuja picada é indolor. As larvas no terceiro estadio e as nymphas de Triatoma e de Rhodnius sugam muito sangue.

Uma nympha de *T. megista* pesa em jejum 0, gr 130; bem cheia pesa uma gramma, sugando pois 0 gr, 870 mais ou menos. Uma nympha de *T. infestans* em jejum pesa 0g,065 approximadamente; cheia, pesa 0g,50 e suga

Dans les expériences d'infestation que j'ai faites avec diverses espèces de Triatomes (T. infestans, T. megista) ou de Rhodnius (R prolixus) j'ai toujours obtenu 100 pour 100 de succès; ce pourcentage distingue ces merveilleux hôtes vecteurs des Glossines qui, dans la maladie du sommeil et autres Trypanosomoses s'infectent dans une proportion minime.

Pour faire une étude systématique et géographique de la maladie de Chagas chez l'Homme ou chez les animaux domestiques ou sauvages du Brésil, je crois que le Xenodiagnostic rendra les plus grands services.

En effet, dans la région de l'intérieur du Brésil où habitent des gens très hospitaliers mais peu familiarisés avec les pratiques médicales, il est déjà difficile, au cours d'une enquëte de faire des frottis de sang en piquant les doigts des enfants. D'ailleurs ces frottis de sang sont généralement inutilisables par suite de la rareté et de la fragilité des *Trypanosoma Cruzi*.

L'examen direct du sang avec le microscope est difficile, car le transport d'un microscope sur la selle d'un mulet présente des inconvénients de toutes sortes et l'examen entier d'une lamelle fait perdre un temps précieux.

Il serait meilleur et plus facile, théoriquement, de prélever quelques centimètres cubes de sang au malade et d'inoculer un cobaye. Mais cette ponction ne serait acceptée que trés rarement et, étant donné le manque d'assistance utile, pourrait présenter de gros dangers au cours d'une expédition.

C'est en présence de ces difficultés d'ordre matériel que je propose l'emploi anodin du Xénodiagnostic.

Tous les malades connaissent les Triatomes et peuvent consentir á se laisser faire une ponction de sang naturelle par ces insectes dont la piqûre est indolore.

Les larves au 3e stade et les nymphes de *Triatoma* et de *Rhodnius* sucent beaucoup de sang. A jeun, une nymphe de *T. megista* pèse 0,g 130; bien gorgée, elle pèse 1 gramme et suce donc environ 0,g 870 de sang.

por conseguinte 0g,435 mais ou menos. A sucção dura no homem de 1/4 a 1/2 hora e é facil alias, para se ganhar tempo, fazer picar ao mesmo tempo varias pessoas ou animaes suspeitos de uma mesma habitação.

As Triatomas repletas de sangue são postas em seguida dentro de tubos separados e rotulados, e collocados, de volta da expedição, na estufa a 30.º onde o desenvolvimento dos Trypanosomas se effectua rapidamente.

Alimentando-se depois estes insectos e examinando-se as suas dejecções, ou então dissecando-os pode-se facilmente verificar os infestados e os indemnes.

Assim é que se pode fazer o Xenodiagnostico, novo meio de investigação destinado a prestar grandes serviços toda a vez que o hospede vector d'uma molestia parasitaria do homem ou dos animaes seja de facil criação em estado pureza e absorva uma bôa quantidade de sangue.

S. Paulo, 2 de Agosto, 1914

Une nymphe à jeun de *T. infestans* pesè environ 0,g 065, gorgée, elle pèse 0,g 50 et suce par consequent environ 0,g 435 de sang.

La durée de la succion sur l'Homme est d'environ 1/4 d'heure à 1/2 heure, il est d'ailleurs facile, pour gagner du temps, de faire piquer simultanément plusieurs personnes ou animaux suspects d'une même habitation.

Les Triatomes gorgées de sang sont ensuite mises dans des tubes à part, étiquetés, et au retour de l'expedition mis à l'étuve a 30º où le dévéloppement des Trypanosomes s'effectue rapidement. En nourissant ensuite ces insectes et en examinant leurs déjections, ou bien en les dissequant on peut facilement determiner ceux qui sont infectés et ceux qui sont indemnes, c'est ainsi que peut se faire le Xenodiagnostic, moyen nouveau d'investigation appelé à rendre de grands services quand l'hôte vecteur d'une maladie parasitaire de l'Homme ou des animaux est facile a élever à l'ètat de pureté et absorbe une bonne quantité de sang.

São Paulo, 2 Août 1914.

=====oOo=====

Alguns novos signaes de hemiplegia organica

OBSERVAÇÕES CLINICAS

PELA

D.RA OLGA BOVERO CAPORALI

Em 1897 Babinski (1) descreveu, com o nome de «Flexão combinada da coxa e do tronco», um phenomeno que frequentemente se encontra na hemiplegia organica, e que serve para o diagnostico differencial entre esta hemiplegia e a hemiplegia hysterica.

Posteriormente, o proprio Babinski e tambem outros Autores, descreveram uma série de novos symptomas que se encontram nos doentes de paresia ou de paralysia organica e não nos hystericos.

De alguns destes symptomas quiz occupar-me, não para estudal-os como symptomas differenciaes entre as duas especies de hemiplegia, porque até agora não tive occasião de observar nenhuma paralysia de natureza funccional, mas sim para conhecer a sua frequencia nos casos de paralysia organica e para comprehender seu mecanismo physio-pathologico.

* *

Os phenomenos, que me propuz estudar, podem dividir-se em dous grupos: os

Comentários

95 Anos da História do Xenodiagnóstico e sua Contribuição para o Diagnóstico Etiológico da Doença de Chagas

Constança Carvalho Britto
Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Marli Maria Lima
Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

No ano de 1914, quando Brumpt introduz o método de Xenodiagnóstico (XD) e demonstra seu potencial de aplicação ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas, a tripanossomíase americana já exigia atenção das autoridades sanitárias brasileiras, tendo em vista as limitações existentes na época em se diagnosticar doenças parasitárias do sangue pelos métodos parasitológicos disponíveis. Em seu trabalho, Brumpt comenta a dificuldade em demonstrar a presença de tripanossomos diretamente no sangue humano ou de animais por meio da microscopia de sangue a fresco, que gerava resultados negativos com freqüência; ou, alternativamente, pelos procedimentos de inoculação em animais suscetíveis ou cultivo *in vitro*, os quais, por sua vez, eram pouco utilizados por constituírem métodos laboriosos. A observação direta ao microscópio, além de pouco sensível, reunia problemas logísticos críticos para sua execução, especialmente quando envolvia expedições em áreas interioranas do Brasil. Brumpt ressalta os inconvenientes de transportar um microscópio na sela de um cavalo durante uma expedição, além do tempo gasto para a leitura de uma lâmina.

O método proposto por Brumpt (1914) consistia em verificar se os hospedeiros invertebrados que atuam como vetores habituais da doença de Chagas, criados em laboratório e livres de infecção, se encontravam infectados após sugarem o sangue de um suposto portador da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*; isto é, o método propiciava o cultivo natural do parasito no seu hospedeiro favorável. Nesse contexto, por que não dizer que o XD foi uma inovação em 'biotecnologia' no início do século XX? De fato, a proposta de Brumpt visava a uma aproximação ao processo natural de transmissão da doença de Chagas, ou seja, triatomíneos vetores eram postos para se alimentar do sangue de paciente suspeito, e o parasito (caso

presente no sangue do paciente), no ato do repasto sangüíneo de seu hospedeiro natural, ia ao encontro do ambiente favorável a seu ciclo de vida; esta seria a grande vantagem do método, por garantir a multiplicação e evolução do *T. cruzi* no seu hospedeiro vetor. Certamente, a demonstração indireta da presença do *T. cruzi* em sangue pelo emprego do XD contribuiu de forma significativa para o melhoramento do diagnóstico etiológico da doença de Chagas, principalmente devido à maior sensibilidade do método decorrente do processo natural de ampliação *in vivo* do parasito no inseto vetor.

Os primeiros relatos do sucesso da aplicação do XD foram observados ainda em 1904, quando Brumpt estudava a evolução dos tripanossomos de peixes e constatou, após um ou vários exames negativos por microscopia de sangue a fresco, o aparecimento de culturas abundantes de parasitos no tubo digestivo de sanguessugas jovens que haviam se alimentado do sangue de peixes considerados livres de infecção. Posteriormente, ele confirma esses achados com a aplicação de sanguessugas no estudo dos tripanossomos de rãs e serpentes do Brasil.

Em relação à doença de Chagas, a primeira aplicação do método foi feita com cobaia infectada com o "vírus da Bahia" (assim ele descreve a cepa de *T. cruzi* inoculada), deixando-se 'picar' o animal por ninfas de terceiro estádio de *Triatoma (Conorhinus) megista*, triatomíneo mais tarde classificado como *Panstrongylus megistus*. Mais uma vez Brumpt ressalta a vantagem do XD em relação aos exames diretos a fresco, que apresentaram resultados negativos de encontro do parasito no sangue da cobaia. No entanto, ao aplicar o método em crianças "atacadas da moléstia de Chagas antiga", o autor só obteve resultados negativos, os quais também foram demonstrados pelos outros meios de diagnóstico. Pressupõe-se que essas crianças estariam na fase crônica da infecção, caracterizada pela parasitemia baixa e transitória, e o próprio autor afirma da certeza de poder evidenciar a infecção nas ninfas de *T. megista*, em se tratando da doença de Chagas recente (fase aguda).

Em seu artigo, Brumpt afirma que os triatomíneos eram capazes de garantir em qualquer "idade" a cultura de *T. cruzi* e que, pelo fato de poderem absorver de dez a quinhentas vezes mais sangue que a quantidade aplicada entre lâmina e lamínula, esses insetos apresentariam vantagem considerável sobre o exame microscópico direto. Da mesma forma, comenta sobre o benefício de se usar triatomíneos em relação à inoculação em cobaias, cujos leucócitos poderiam destruir alguns raros tripanossomas inoculados com o sangue de um doente. Em seus experimentos, diversas espécies de triatomíneos (*Triatoma infestans*, *T. megista*), além do *Rhodnius prolixus*, foram testadas, obtendo-se sempre 100% de sucesso. Essa grande suscetibilidade dos triatomíneos ao desenvolvimento do *T. cruzi* fez com que Brumpt os qualificasse de "maravilhosos hospedeiros vetores".

Brumpt descreve a simplicidade de se criar triatomíneos isentos de infecção por flagelados e sugere a aplicação do XD utilizando-se ninfas de terceiro estádio (que sugam uma boa quantidade de sangue) aos estudos sistemáticos e geográficos da doença de Chagas no Brasil, que se propunham a investigar a presença do *T. cruzi* no homem ou em animais domésticos ou silvestres. O autor relata que os habitantes de regiões interioranas do Brasil eram pouco familiarizados com práticas médicas e que, muitas vezes, durante um inquérito epidemiológico, tornava-se difícil obter uma gota de sangue dos dedos das crianças, além do fato de esse material em geral não poder ser utilizado devido à raridade e fragilidade do parasito. Brumpt argumenta que os doentes nas localidades do interior do país conheciam os *Triatomas* e poderiam consentir em se deixarem 'picar' por esses insetos, cuja picada era indolor.

Segundo Brumpt, a sucção no homem teria duração aproximada de 15 a 30 minutos, e para se ganhar tempo o método poderia ser aplicado, em uma mesma habitação, simultaneamente

em várias pessoas ou animais suspeitos. Em seguida, os triatomíneos repletos de sangue eram colocados separadamente dentro de tubos e rotulados. De volta das expedições, os insetos eram mantidos em estufa a 30ºC para o rápido desenvolvimento dos tripanossomos. Em seu artigo, Brumpt não menciona por quanto tempo os insetos eram mantidos em estufa até o momento da investigação parasitológica para a presença do *T. cruzi*. No laboratório, os insetos eram alimentados em animais normalmente refratários ao parasito (pombos, galinhas) e a pesquisa do *T. cruzi* era feita por meio do exame das dejeções a fresco, ou após dissecção dos triatomíneos pelo exame do conteúdo intestinal.

A partir dos anos 30 do século XX, a introdução de uma série de procedimentos, abordando distintos aspectos, constituiu valiosa contribuição para favorecer o procedimento do XD: (i) escolha da espécie de triatomíneo, sendo recomendado o uso de uma espécie local, ou seja, o transmissor natural mais importante da doença na região estudada (Dias, 1940); (ii) definição do estádio das ninfas e do número de insetos por prova; (iii) definição do número de repetições do teste e duração de sua aplicação. Segundo Schenone (1999), as informações disponíveis não permitiam estabelecer um critério uniforme para essas questões. Na maioria das vezes os resultados não foram satisfatórios em casos suspeitos da doença de Chagas, particularmente nas infecções crônicas. Diante dessa situação, foi sugerida a realização de exames seriados de XD (Dias, 1940), semelhantes às técnicas empregadas em outras infecções parasitárias, o que contribuiu de forma significativa para o aumento da positividade do exame parasitológico nos pacientes crônicos (Castro, Alves & Macedo, 1983; Coura *et al.*, 1991). Outra recomendação referia-se ao exame rotineiro dos triatomíneos 30, 60 e 90 dias após a aplicação do método. A aplicação do XD pelo emprego simultâneo de quarenta ninfas de triatomíneos distribuídas em quatro dispositivos contendo grupos de dez insetos cada revelou ser um procedimento com bom desempenho para a avaliação da parasitemia na doença crônica (Borges-Pereira *et al.*, 1989, 1996; Coura *et al.*, 1991). Bronfen e colaboradores (1989) relataram um aumento da sensibilidade do XD após semeadura do conteúdo intestinal das ninfas de triatomíneos em meio LIT modificado, dando a esse procedimento o nome de xenocultura (a técnica facilitou o isolamento de cepas de *T. cruzi*).

O método inicialmente descrito referia-se ao XD clássico (natural), em que os triatomíneos em contato direto com a pele do paciente podiam causar irritação local com surgimento de máculas ou pápulas pruriginosas e, mais raramente, choque anafilático. Ainda na década de 40, uma solução para evitar as reações alérgicas decorrentes das picadas dos triatomíneos foi a introdução, por Romaña e Gil (1947), do XD artificial. Todavia, esse ensaio *in vitro* não foi usado na rotina durante anos, provavelmente por falta de uma membrana apropriada e de um anticoagulante adequado, o que dificultou seu emprego mais sistemático (Pineda, Luquetti & Castro, 1998). Somente nas últimas décadas o método artificial despertou interesse, principalmente devido aos casos de reativação da doença de Chagas em cardiopatas transplantados e em imunossuprimidos, sobretudo aidéticos (Souza *et al.*, 1988). Estudos visando à comparação dos dois métodos *in vivo* e *in vitro* apresentaram resultados similares (Freitas *et al.*, 1955; Pineda, Luquetti & Castro, 1998). Além disso, o XD artificial apresenta as vantagens de ser mais confortável para o paciente, eliminar eventuais reações alérgicas e permitir repetições do exame com maior facilidade. Atualmente, devido a questões éticas, o método de escolha tem sido o XD artificial, o qual consiste na coleta de 10 ml de sangue que são então colocados em uma bolsa de látex ou *condom*, com aquecimento externo, onde as ninfas são postas para se alimentarem; a leitura é feita após 30, 45 e 60 dias.

Apesar das mencionadas facilidades quanto à criação ou obtenção de triatomíneos, seu transporte, aplicação e exame dos insetos, as quais sugeriam a maior conveniência de

aplicação da "prova do barbeiro", sobretudo nas investigações epidemiológicas em grande escala, essa modalidade de diagnóstico inicialmente foi pouco utilizada. Os primeiros registros que demonstram a eficácia do método no diagnóstico etiológico da doença de Chagas foram feitos em 1933 por Torrealba, que encontrou 25% de chagásicos entre os colonos de Guárico, na Venezuela (Torrealba, 1958). Dias (1940) foi o primeiro a estabelecer critérios para a utilização desse método, especialmente no que diz respeito ao triatomíneo a ser utilizado. Entretanto, o método só passou a ser empregado rotineiramente após sua padronização por Cerisola e colaboradores, em 1974.

O impacto do XD pode ser evidenciado se considerarmos sua aplicação há mais de noventa anos por pesquisadores e clínicos, trazendo grande contribuição ao diagnóstico e à pesquisa da doença de Chagas, no que tange ao potencial do método para o isolamento de cepas do parasito em humanos e outros mamíferos acometidos, assim como à avaliação da parasitemia e sua correlação com as condições clínicas da doença. Na década de 70 do século XX, o método passou a ser sistematicamente usado como ferramenta confiável para a seleção e avaliação de pacientes chagásicos que receberam quimioterapia específica (Schenone *et al.*, 1970; Cançado *et al.*, 1973; Cerisola *et al.*, 1977).

O diagnóstico parasitológico da doença de Chagas apresenta maior complexidade na infecção crônica do que nos casos agudos. Embora tenham ocorrido aprimoramentos no diagnóstico parasitológico de fase crônica, a baixa sensibilidade dos exames indiretos ainda é um fator que limita sua aplicação no diagnóstico e controle pós-terapêutico. Dados da literatura indicam uma positividade do XD aplicado à fase crônica variando entre 9 e 87,5%, dependendo da região estudada (revisto por Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003). Estudos comparativos com ninfas de espécies diferentes foram realizados, visando a encontrar a melhor espécie a ser aplicada ao exame (Cerisola, Rohwedder & Del Prado, 1971; Moreira & Perlowagora-Szumlewicz, 1997). Foi sugerida a associação entre os métodos de XD e hemocultura para obtenção de uma sensibilidade máxima para a detecção do *T. cruzi* em pacientes na fase crônica da doença (Neal & Miles, 1977).

Por outro lado, avanços no campo da biologia molecular permitiram o desenvolvimento de novas ferramentas, como a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que, introduzida na década de 90 para a amplificação de ácidos nucléicos do *T. cruzi* em amostras de pacientes portadores da infecção crônica, vem sendo cada vez mais empregada no diagnóstico molecular da doença de Chagas (Avila *et al.*, 1991; Britto *et al.*, 1993, 1995; Wincker *et al.*, 1994; Junqueira, Chiari & Wincker, 1996). A maior sensibilidade da técnica, que possibilita verificar a presença de um parasito em 20 ml de sangue, aponta para sua aplicação como método confirmatório no diagnóstico de pacientes com provas sorológicas duvidosas e como método auxiliar no controle pós-terapêutico da doença crônica, em comparação com as técnicas sorológicas e parasitológicas, embora exista preocupação quanto à especificidade da técnica quando realizada em serviços de rotina. Além disso, ensaios de PCR aplicados à doença de Chagas ainda não se encontram comercializados.

Nos dias atuais, o emprego do XD como rotina torna-se bastante restrito, devido à sua baixa sensibilidade e a limitações outras inerentes à técnica, tais como o tempo prolongado para o resultado final (alguns pesquisadores relatam um período de até 90 dias); a necessidade de estabelecer colônias de triatomíneos no laboratório; a morte dos insetos durante o período de teste e a rejeição do paciente à aplicação repetida do exame ao natural. A leitura do exame deve ser feita por técnico bem treinado, considerando-se a presença eventual de *Trypanosoma rangeli* e/ou *Blastocrithidia triatomae* no conteúdo intestinal dos triatomíneos (Cerisola *et al.*, 1971).

Ressalta-se, porém, o grande valor diagnóstico dos testes parasitológicos quando positivos. Durante a interpretação dos resultados, um XD positivo em indivíduo suspeito (quadro clínico, sorologia positiva e/ou antecedentes epidemiológicos) significa infecção pelo *T. cruzi* e pode confirmar uma etiologia chagásica; todavia, um resultado negativo não indica necessariamente ausência do parasito; nesse caso, deve-se proceder à repetição do exame. Porém, a despeito dos problemas que o XD *in vivo* ou *in vitro* possa apresentar, bem como da grande precisão que os métodos moleculares têm trazido ao diagnóstico da doença de Chagas, como enfatizam Opinel e Gachelin (2005), a contribuição de Brumpt para a definição e o diagnóstico, assim como para o conhecimento da biologia do parasito, ainda nos primórdios da descoberta da endemia, é de valor inestimável.

Agradecimentos

A Carlos R. Alves, pelas sugestões e idéias que contribuíram de certa forma para a elaboração do presente texto.

REFERÊNCIAS

AVILA, H. A. *et al.* Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 48: 211-222, 1991.

BORGES-PEREIRA, J. *et al.* Parasitemia em pacientes chagásicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22: 39-44, 1989.

BORGES-PEREIRA, J. *et al.* Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica. I. Sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29: 241-247, 1996.

BRITTO, C. *et al.* A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 171-172, 1993.

BRITTO, C. *et al.* Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*, 110: 241-247, 1995.

BRONFEN, E. *et al.* Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84: 237-240, 1989.

BRUMPT, E. O xenodiagnóstico: aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e em particular à tripanossomose de Chagas. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia*, 3: 97-102, 1914.

CANÇADO, J. R. *et al.* Bases para avaliação do tratamento específico da doença de Chagas humana segundo a parasitemia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 7: 156-166, 1973.

CASTRO, C. N.; ALVES, M. T. & MACEDO, V. O. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 16: 98-103, 1983.

CERISOLA, J. A.; ROHWEDDER, R. W. & DEL PRADO, C. E. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatominos. *Boletín Chileno de Parasitología*, 26: 57-58, 1971.

CERISOLA, J. A. *et al. Blastocrithidia triatomae n. sp.* found in *Triatoma infestans* from Argentina. *The Journal of Protozoology*, 18: 503-506, 1971.

CERISOLA, J. A. *et al. El Xenodiagnóstico. Normalización. Utilidad.* Buenos Aires: Imprenta Instituto Nacional de Investigaciones Cardiológicas, 1974.

CERISOLA, J. A. *et al*. Evaluación mediante xenodiagnóstico de la efectividad del nifurtimox en la infección chagásica crónica. *Boletín Chileno de Parasitología*, 32: 51-62, 1977.

COURA, J. R. *et al*. Evaluation of the xenodiagnosis of chronic Chagas patients infected ten years or over in an area where transmission has been interrupted: Iguatama and Pains, West Minas Gerais State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86: 395-398, 1991.

DIAS, E. Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 35: 335-342, 1940.

FREITAS, J. L. P. *et al*. Estudo comparativo entre xenodiagnósticos praticados 'in vivo' e 'in vitro' em formas crônicas de moléstia de Chagas. *O Hospital*, 17: 101-110, 1955.

JUNQUEIRA, A. C. V.; CHIARI, E. & WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas' disease in endemic region of North-Eastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 129-132, 1996.

MOREIRA, C. J. C. & PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Attempts to improve xenodiagnosis: comparative test of sensitivity using *Rhodnius neglectus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma vitticeps*, *Triatoma infestans* in endemic areas of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 91-96, 1997.

NEAL, R. A. & MILES, R. A. The sensitivity of culture methods to detect experimental infections of *Trypanosoma cruzi* and comparison with xenodiagnosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 19: 170-176, 1977.

OPINEL, A. & GACHELIN, G. Emile Brumpt's contribution to the characterization of parasitic diseases in Brazil, 1909-1914. *Parassitologia*, 47: 299-307, 2005.

PINEDA, P. J.; LUQUETTI, A. & CASTRO, C. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31: 473-480, 1998.

PORTELA-LINDOSO, B. A. A. & SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Revista de Saúde Pública*, 37: 107-115, 2003.

ROMAÑA, C. & GIL, L. Xenodiagnóstico artificial. *Anales del Instituto de Medicina Regional de Tucumán*, 2: 57-60, 1947.

SCHENONE, H. Xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 289-294, 1999.

SCHENONE, H. *et al*. Valor do xenodiagnóstico na avaliação do tratamento da infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista Goiana de Medicina*, 16: 179-184, 1970.

SOUZA, H. B. W. T. *et al*. Estudo sobre o xenodiagnóstico 'in vitro'. II – Comparação com o xenodiagnóstico 'in vivo'. *Revista do Hospital das Clínicas*, 43: 165-167, 1988.

TORREALBA, J. F. *Investigaciones sobre la Enfermedad de Chagas en San Juan de los Morros*. Caracas: Imprenta Nacional, 1958.

WINCKER, P. *et al*. Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51: 771-777, 1994.

Xenodiagnóstico: reflexões sobre o desenvolvimento do método e sua importância nos estudos sobre a doença de Chagas

Liléia Diotaiuti
Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas
Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz

Émile Brumpt representa muito bem um grupo de naturalistas do final do século XIX e início do século XX, quando a descoberta do mundo dos micróbios já se consolidara por intermédio de inúmeros cientistas que, formados no Instituto Pasteur ou sob a influência deste, distribuíam-se pelo mundo como pesquisadores que se integrariam às mais importantes escolas de parasitologia, o que resultou em uma verdadeira explosão do número de parasitas descritos! Brumpt tinha 13 anos quando a teoria de Pasteur sobre a origem dos microrganismos foi aceita pela Academia Francesa de Ciência (1864). Naturalista licenciado em zoologia, botânica e geologia (1896), e posteriormente doutor em medicina (1906), tinha uma sólida formação que lhe possibilitou uma compreensão integral da natureza. Antes de vir para o Brasil, em 1903, havia participado de importantes excursões para a África e o Oriente, onde desenvolveu estudos sobre, entre outros, a malária e a doença do sono, incluindo o parasita e as moscas tse-tsé, e tripanossomas de peixes cuja transmissão ele determinou se dar por sanguessugas. Sua vivência como parasitologista já lhe havia ensinado as dificuldades para o diagnóstico de "moléstias parasitárias do sangue". Apesar de a reação de Guerreiro-Machado ter sido publicada em 1913, sua utilização era restrita, devido à complexidade na preparação dos reagentes e reprodutibilidade. Na verdade, o diagnóstico sorológico só avançou a partir das décadas de 60 e 80 do último século, e mesmo assim com muitas restrições. A demonstração do parasita no hospedeiro é prova contundente para que o médico decida sobre o encaminhamento clínico do paciente; tal informação tornou-se ainda mais importante a partir do advento, em 2005, do tratamento específico dos casos agudos ou pacientes na fase crônica ainda recente: "Nas tripanossomoses em particular, não só no homem como nos animais mais diversos, sabe-se como é difícil a existência dos tripanossomas, pelo exame direto".

O interesse pela doença descrita por Carlos Chagas era muito grande na ocasião. Convidado para organizar um curso de parasitologia na Faculdade de Medicina de São Paulo, Brumpt vem ao Brasil e passa a estudar parasitas brasileiros. A proposta do xenodiagnóstico vem do amadurecimento de uma seqüência de observações que inclui o estudo de peixes parasitados por um tripanossoma. Alimentando sanguessugas sobre serpentes e batráquios, os anelídeos também se infectaram com tripanossomas, comprovando a utilidade desse procedimento como método diagnóstico. Esses estudos não foram observações triviais, mas objeto do trabalho de Brumpt realizado em outros continentes e no Brasil no período de 1904 a 1914, quando o autor interrompeu suas pesquisas para uma "brusca partida para a guerra franco-alemã" e foi para Paris servir como médico em um hospital militar.

Na oportunidade do artigo aqui comentado, Brumpt aproveita para oferecer alguns detalhes não publicados sobre suas pesquisas acerca da sanguessuga *Placobdella brasiliensis*, espécie descrita pelo próprio autor em 1914, e hospedeiro do *Trypanosoma leptodactyli*. Ele observa que a sanguessuga completa sua alimentação em diversas espécies de rãs, crocodilos, serpentes, tartarugas, mas se recusa a se alimentar de alguns sapos ou peixes, evidenciando aspectos relacionados à suscetibilidade/refratariedade entre parasitas e hospedeiros. Descreve

o número de repastos necessários para o animal tornar-se adulto, o procedimento de cópula, fecundação e postura de ovos, o desenvolvimento do *T. brasili* (parasita de serpentes) no estômago da sanguessuga, com produção de inúmeras formas metacíclicas que, segundo o autor, "não passam para a bainha da tromba, mesmo depois de vários meses, e é provável que a serpente se infeste ingerindo as sanguessugas parasitadas". Todos esses detalhes demonstram a capacidade de Brumpt para diferenciar morfologicamente espécies de tripanossomas hoje desconhecidas nas mais tradicionais escolas de parasitologia, que dependem de métodos moleculares para diferenciação das espécies cuja identificação depende da disponibilidade de seqüências gênicas conhecidas para serem usadas para a produção de marcadores específicos.

Nesse contexto, Brumpt, atento às novidades, experimenta com sucesso o diagnóstico de uma cobaia infectada com *Trypanosoma cruzi*, mas sem parasitemia patente, fazendo-a ser picada pelo que ele chamava de larvas de terceiro estádio de *Triatoma (Conohinus) megista*, hoje *Panstrongylus megistus*. A mesma experiência em crianças que ele define como "atacadas da moléstia de Chagas, antiga" teve resultado negativo, mas o autor já antecipa que "em casos recentes da moléstia de Chagas a infecção certamente se faria". Por suas experiências no desenvolvimento da técnica do xenodiagnóstico, Brumpt confirma que todos os estádios pós-embrionários de triatomíneos se infectam com o *T. cruzi*, também determinando o tamanho do repasto nos diferentes estádios, quando postula que os triatomíneos ingerem sangue em quantidade de dez a quinhentas maior "que a quantidade (...) que se pode pôr entre lâmina e lamínula", ou seja, 50 microlitros (Brener, 1961); ou mesmo medindo o repasto sangüíneo de ninfas de quinto estádio de *Triatoma infestans* e *T. megista* (*Panstrongylus megistus*). O artigo também antecipa que o *T. cruzi* cresce dentro dos triatomíneos livres da agressão de células do sistema imune, como se observa em cobaias inoculadas com o sangue de um doente e onde se evidencia a destruição de parasitas por leucócitos; realmente, até hoje não há comprovação de que o *T. cruzi* cause algum dano aos seus vetores (Billingsley & Downe, 1983). Além disso, ainda na perspectiva da infecção dos vetores, segundo Brumpt a proposta de utilização do xenodiagnóstico para a identificação do parasitismo pelo *T. cruzi* é reforçada pela alta infecção experimental de *Triatomas* (*T. infestans* e *T. megista*) ou de *Rhodnius* (*R. prolixus*), "estes maravilhosos hospedeiros vetores, em comparação com as glossinas e em outros tripanossomas de animais, que se infectam em proporção baixa".

Muito oportunamente, o xenodiagnóstico é proposto por Brumpt para ser utilizado em estudo sistemático e geográfico da moléstia de Chagas no homem e nos animais domésticos ou selvagens do Brasil. As alternativas da época eram o exame direto do sangue do paciente ao microscópio, entre lâmina e lamínula, ou a inoculação de cobaias, procedimentos complexos e quase inviáveis nas condições de campo, em transporte realizado a cavalo para remotas regiões do interior do Brasil. Mesmo que só esporadicamente recomendado como método de diagnóstico da infecção humana, o xenodiagnóstico segue como uma das formas mais fáceis de confirmação da infecção de reservatórios silvestres, permitindo o isolamento de amostras de *T. cruzi* para seu seguimento em meio de cultura (Bronfen *et al.*, 1989) ou para caracterização direta da linhagem do parasita (Liarte, 2006).

Pela importância clínico-epidemiológica da utilização do xenodiagnóstico, muitos foram os seguidores de Brumpt no esforço de aprimoramento do método, com artigos e teses para determinação das espécies naturalmente mais suscetíveis ao *T. cruzi* (Szumlevicz, Muller & Moreira, 1990), do número de triatomíneos, do estádio ideal de desenvolvimento e do tempo ideal para exame destes (Cerisola *et al.*, 1974), com a busca de cepas de triatomíneos com maior suscetibilidade ao parasita (triatomíneos irradiados, seleção genética de cepas mais suscetíveis)

(Phillips & Bertram, 1967), e com a soma complementar de dois métodos de amplificação dos parasitas (xeno e cultivo do conteúdo intestinal dos triatomíneos em meio LIT) (Bronfen *et al.*, 1989). Para Brumpt, a picada dos triatomíneos é indolor. Sabemos que não é exatamente assim, e também que a reação do hospedeiro à picada não é igual para todas as espécies e pode causar bastante incômodo ou reações graves do paciente (Pereira *et al.*, 2006). Para o diagnóstico humano, o xenodiagnóstico caiu em desuso diante das novas possibilidades (MS/SVS, 2005); de fato, a imagem de quarenta triatomíneos sugando ao mesmo tempo os braços de uma pessoa é assustadora. O artigo de Brumpt, entretanto, deve ser apreciado como uma peça realmente rara da literatura científica, desenhado dentro dos rigores metodológicos da ciência, como uma verdadeira aula apresentada por um mestre da zoologia!

REFERÊNCIAS

BILLINGSLEY, P. F. & DOWNE, A. E. R. Ultraestructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Heteroptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology*, 61: 2.574-2.586, 1983.

BRENER, Z. *Contribuição ao Estudo da Terapêutica Experimental da Doença de Chagas*, 1961. Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.

BRONFEN, E. *et al.* Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84(2): 237-240, 1989.

CERISOLA, J. A. *et al. El Xenodiagnóstico*. Buenos Aires: Instituto Nacional de la Enfermedad de Chagas Dr. Mario Fatala Chaben, 1974.

LIARTE, D. B. *Desenvolvimento de uma PCR Multiplex Capaz de Detectar e Classificar Cepas de* Trypanosoma cruzi *em Amostras Clínicas e de Campo*, 2006. Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, supl. III: 11-14, 2005.

PEREIRA, H. *et al.* Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends in Parasitology*, 22(11): 516-520, 2006.

PHILLIPS, N. R. & BERTRAM, D. S. Laboratory studies of *Trypanosoma cruzi* infections. *In*: *Rhodnius prolixus*, larvae and adults. *In*: *Triatoma infestans*, *T. protracta* and *T. maculata*-adults. *Journal of Medical Entomology*, 4(2):168-171, 1967.

SZUMLEWICZ, A. P.; MULLER, C. A. & MOREIRA, C. J. C. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts Chagas disease. 4. The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Saúde Pública*, 24(3): 165-177, 1990.

Cecilio Romaña

Acerca de um síntoma inicial de valor para o
diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas.
La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral: hipótesis sobre la
puerta de entrada conjuntival de la enfermedad.
Publicaciones Mepra, 22: 16-28, 1935.

Cecilio Romaña (1901-1997)

Médico argentino, desenvolveu pesquisas sobre a patologia, a clínica, a epidemiologia e o controle da doença de Chagas. Descreveu o mais típico dos sinais de porta de entrada da doença de Chagas humana: a lesão ocular que ficou conhecida como sinal de Romaña.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
MISIÓN DE ESTUDIOS DE PATOLOGÍA REGIONAL ARGENTINA
JUJUY

Jefe: doctor SALVADOR MAZZA

INVESTIGACIONES SOBRE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

I

HALLAZGO DE TRIPANOSOMAS EN MURCIELAGOS DEL CHACO Y LEDESMA, JUJUY

Por el doctor SALVADOR MAZZA

II

SOBRE EL HALLAZGO DE UN NUEVO EDENTADO, HUESPED NATURAL DE «SCHIZOTRYPANUM CRUZI» EN LA PROVINCIA DE MENDOZA

Por los doctores SALVADOR MAZZA y J. S. MIYARA (Mendoza)

III

ACERCA DE UN SINTOMA INICIAL DE VALOR PARA EL DIAGNOSTICO DE FORMA AGUDA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Por el Dr. CECILIO ROMAÑA (Villa Guillermina, Santa Fe)

IV

COMPROBACION DE «TRIATOMA PLATENSIS» NEIVA 1913 EN LA PROVINCIA DE MENDOZA

Por los Dres. SALVADOR MAZZA, S. MIYARA y G. y R. BASSO

PUBLICACIÓN N° 22

BUENOS AIRES
IMPRENTA DE LA UNIVERSIDAD

1935

por "Tripanosoma cruzi", en *La prensa médica argentina*, enero 30 de 1930 y Publicación n.° 1, M.E.P.R.A.

(6) Mazza, S., Romaña, C., *Nuevas observaciones sobre la infección espontánea de armadillos del país, por "Trypanosoma cruzi"*, en *La prensa médica argentina*, febrero 28 de 1931 y Publicación n.° 3, M.E.P.R.A.

(7) Clark, H., y Dunn, L. H., *Experimental Studies on Chagas' Disease in Panamá*, en *The American Journal of Tropical Medicine*, vol. XII, n.° 1, enero 1932 pág. 49.

(8) Niño, Flavio L., *Contribución al estudio de la enfermedad de Chagas*, en Monografía n.° 1 de M.E.P.R.A., imprenta de la Universidad de Buenos Aires, 1929.

(9) Mazza, S., y Jörg, M. E., Publicación n.° 15, M.E.P.R.A.

(10) Mazza, S. *Observación de infección espontánea del perro por "Schizotripanum cruzi"*, en *Primera Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional del Norte*, Jujuy, mayo 1926.

(11) Mazza, S., Publicacin n.° 17, M.E.P.R.A., septiembe 6 de 1934.

(12) Mazza, S., y Romana, C., *Infección espontánea de la comadreja del Chaco santafecino por "Trypanosoma cruzi"*, en *Séptima Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional del Norte*, Tucumán, 5, 6 y 7 de octubre de 1931, pág. 981.

(1) Mazza, S., Publicación n.° 17, M.E.P.R.A., cap. IV, Imprenta de la Universidad de Buenos Aires, septiembre 6 de 1934.

III

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

MISIÓN DE ESTUDIOS DE PATOLOGÍA REGIONAL ARGENTINA

JUJUY

Jefe: doctor SALVADOR MAZZA

Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas

La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral

(Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad)

POR EL DR. CECILIO ROMAÑA (VILLA GUILLERMINA, SANTA FE)

El primer paciente de forma aguda de enfermedad de Chagas que tuvimos oportunidad de observar en Villa Guillermina, durante el mes de febrero de 1932 y que publicáramos bajo los auspicios de la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (1) había presentado como síntoma inicial de su dolencia, hinchazón del ojo izquierdo, se-

guida más tarde por generalización del edema al otro ojo y posteriormente a la cara y al cuerpo.

La madre atribuía esta inflamación a una picadura de insecto desconocido, que el niño sufrió mientras dormía. El examen somático demostró reacción ganglionar preauricular y parotídea muy marcada del mismo lado del edema ocular inicial y que llegó a deformar la región. Los demás síntomas del enfermito, así como el hallazgo de *S. cruzi* en gota gruesa, permitieron establecer claramente la etiología esquizotripanósica de los fenómenos oculares, como en aquella publicación se relata.

Cuando tuvimos oportunidad de examinarlo, varios días después de la iniciación del proceso, nos hallamos aún en presencia de un gran predominio del edema en el ojo izquierdo ,acompañado de intensa adenopatía satélite, impresionándonos fuertemente el hecho, hasta sugerirnos la hipótesis de ser la conjuntiva puerta de entrada de la infección. Nos quedó la íntima convicción de que en la conjuntiva de dicho ojo, debía hallarse, como ya dejamos constancia en la publicación referida, el sitio de penetración del *S. cruzi* en el organismo humano. Ello nos planteó el interrogante, de si no sería frecuente este hecho como síntoma inicial de la enfermedad. No teníamos entonces elementos de juicio suficientes para aclarar esta sospecha, ya que allí comenzaba y terminaba nuestra experiencia sobre la afección, pero al multiplicarse últimamente nuestras observaciones de casos agudos, la posibilidad de ser la conjuntiva la común puerta de entrada de las formas infectantes del S. cruzi, fué adquiriendo solidez en nuestra mente, encontrándonos ahora y especialmente después de nuestras tres últimas observaciones, en condiciones de fundar seriamente esta hipótesis, al mismo tiempo que de deschibir la *conjuntivitis tripanósica unilateral* con su adenopatía satélite, como síntoma llamativo y frecuente, de comienzo de la Enfermedad de Chagas.

En efecto, *nueve* suman hasta la fecha los casos agudos de tripanosomiasis americana que llevamos observados, habiendo podido establecer claramente en *seis* de ellos que la afección comenzó por la inflamación de uno de los ojos, es decir, en el 66 % de los casos. Este hecho, deja en estas condiciones de ser una mera coincidencia para imponerse por sí solo como síntoma de gran valor para presumir la enfermedad en su comienzo.

Pasaremos, pues, a relatar brevemente el principio de la afección en nuestros distintos pacientes, con la intención de detenernos más en el examen de los tres últimos casos que hemos observado, para documentar nuestro punto de vista.

1. I. M., 8 años de edad. El 1.º de febrero de 1932 siendo de madrugada despierta el niño con una sensación de intensa molestia en el *ojo izquierdo* La madre (que es la informante de estos antecedentes) dice que pensó desde el primer momento que podía tratarse de la pica-

dura de una araña o de una vinchuca, abundantes en el rancho que habitaban

Esa misma tarde notaron el *ojo hinchado*. Aumentó este edema considerablemente para el día siguiente, apareciendo en el ángulo externo del borde palpebral un punto rojo a manera de orzuelo, sin ser muy doloroso. Este edema continuó intenso y casi indoloro en los días que siguieron, notando la madre que también apareció en el ojo derecho dos o tres días después. En esta misma fecha se notaron hinchazones auriculares y parotídeas del lado izquierdo. Al día siguiente de la aparición del edema parpebral, la madre notó que el niño tenía fiebre, especialmente por la tarde.

El examen somático de los ojos demostró: Derecho ligero edema parpebral, sin nada de particular en conjuntiva, córnea, iris, etc.; *izquierdo,* ambos párpados con gran infiltración edematosa especialmente el inferior. La conjuntiva roja y vascularizada, sobre todo en su ángulo externo, donde también se podía notar edema. En córnea e iris nada de particular. La motilidad ocular conservada. La pupila reaccionaba bien con la luz y la acomodación.

En la *región preauricular izquierda se notaba un ganglio* del tamaño de un huevo de paloma asentado en una base infiltrada, que se extendía a la región parotídea vecina y retroauricular, donde también se palpaban ganglios de tamaño semejante al anterior, hecho que unido a la periadenitis que los envolvía deformaba la región. Todos estos ganglios no eran dolorosos.

En este niño se observaron otros síntomas descriptos por Chagas para la fase aguda de la enfermedad, con excepción de hipertrofia de tiroides, además de haberse hallado *S. cruzi* en gota gruesa de sangre. El edema se generalizó discretamente a todo el cuerpo, desapareciendo más tarde paulatinamente. La inflamación ocular desapareció igualmente sin dejar rastros. El niño es observado periódicamente con el objeto de trazar estudio complementario de lo ya publicado y que se dará a conocer oportunamente, encarando la enfermedad desde otros puntos de vista.

2. C. C., 2 años de edad. Mayo de 1933. (Chaco Austral). En la historia clínica de esta enfermita publicada junto con la anterior (1) se lee que la enfermedad comenzó por edema de la cara y *sobre todo de los párpados,* extendiéndose a las extremidades y al cuerpo. En cuanto a la reacción ganglionar fué también de mayor tamaño en el cuello donde los ganglios alcanzaron el desarrollo de un poroto, habiendo uno del tamaño aproximado de una almendra por *debajo de la oreja izquierda.*

En esta niña se comprobaron *S. cruzi en gota* gruesa de sangre y se apreciaron otros síntomas clínicos de E. de Chagas. La niñita ha sido observada últimamente por nosotros encontrándola aparentemente en buenas condiciones de salud.

3. R. F., 1 año de edad. La Gallareta (Santa Fe) Este caso fué publicado en colaboración con el Profesor Mazza en la publicación n.º 15 de la Misión de E. de P. R. Argentina (2). La madre relataba que al despertar la niña un día notó que el párpado inferior del *ojo izquierdo estaba muy hinchado.* También el párpado superior del mismo ojo se edematizó en el transcurso del día mostrándose la niña intranquila y aparentemente febril. Parecía ser pruriginosa la lesión del ojo y de la piel vecina, pues la paciente tendía siempre a frotarse la región.

Durante cinco días se acentuaron estos síntomas y al sexto el edema invadió el ojo derecho y luego todo el cuerpo, haciéndose particularmente apreciable en la cara y las extremidades. El examen somático practicado en ese momento demostró, anasarca: el edema era particularmente apreciable en la cara y sobre todo en los párpados del ojo izquierdo, el cual estaba casi completamente cerrado. Las conjuntivas estaban ligeramente congestionadas. No se hallaba nada más de particular en los ojos.

En la *fosa supraclavicular izquierda* se palpaban ganglios del tamaño de un grano de maíz movibles e indoloros.

Esta enfermita presentaba gran cantidad de *S. cruzi* en gota gruesa, parásitos que también se comprobaron en preparaciones examinadas en fresco. Esta paciente sucumbió pocos días después del comienzo de su tripanosomiasis a causa de meningitis neumocóccica, lo que pudo ser establecido claramente por la autopsia, aunque el profesor Mazza comprobó en el examen histológico del miocardio la subsistencia de lesiones que según sus investigaciones con Jörg son características para la enfermedad de Chagas.

4. A. L., 1 año de edad. Villa Ana. Enero de 1934 Este caso, así como los dos siguientes han sido presentados al V° Congreso Nacional de Medicina reunido en Rosario (1934) y forman parte de la publicación n.º 20 de la M. E. P. R. A. La enfermedad comenzó con fiebre y edema cuyo punto de partida fué una lesión de aspecto furunculoso, roja, dura, ligeramente dolorosa y descamándose en pequeñas costras, que se desarrolló en la sien derecha en las vecindades del ángulo externo del ojo del mismo lado. Este edema duro e indoloro deformaba el lado derecho de la cara, haciendo desaparecer sus detalles anatómicos y extendiéndose a los párpados del ojo del mismo lado y también al opuesto, aún cuando en menor proporción.

Las conjuntivas tanto palpebral como bulbar estaban vascularizadas y también edematosas. En córnea e iris no se notaba nada de particular. En el cuello se palpaban ganglios del tamaño de porotos y maíces.

Este niño, que tenía regular cantidad de *S. cruzi* en la circulación sucumbió a los 24 días de enfermedad en adinamia, hipotermia y cianosis, después de haber tenido elevada temperatura y convulsiones.

5. W. T., 10 años de edad. Villa Ana. Enero de 1934. En este

enfermito la afección comenzó en forma vaga, orientándose hacia el diagnóstico de Tripanosomiasis el ligero edema generalizado que acusaba, visible especialmente en párpados y extremidades. Deseamos hacer resaltar sin embargo el hecho de ser *subxamiliar la adenopatía de mayor volumen.*

En este niño, que presentaba escasos *S. cruzi* en la circulación, la enfermedad evolucionó en forma benigna no presentando en un examen efectuado hace pocos días síntomas aparentes del proceso.

6. E. T., 4 años edad. Villa Ana. Enero de 1934. Esta paciente en la cual se hizo tan sólo un diagnstico clínico de Tripanosomiasis, pues había pasado ya la fase aguda de la enfermedad y no se pudieron identificar *S. cruzi en la circulación,* comenzó su enfermedad por la inflamación *de uno de los ojos,* hecho que fué desde el primer momento atribuído por la familia a picadura de vinchuca, sorprendida durante la noche junto a la cabeza de la enfermita.

El edema posteriormente se generalizó al otro ojo y al cuerpo, habiendo ya casi desaparecido cuando tuvimos oportunidad de observarla. No obstante ello, presentaba otros síntomas clínicos de la enfermedad.

En el cuello eran palpables ganglios de varios tamaños, especialmente submaxilares, donde alcanzaban el de una avellana.

Esta niñita ha sido examinada de nuevo por nosotros hace poco tiempo hallándola en buen estado general, aun cuando siempre es posible notar una poliadenopatía generalizada.

—Nuestras tres últimas observaciones, muy recientes aún, pues datan de noviembre y diciembre 1934, merecen por la claridad de su sintomatología ocular un examen más detenido. Las historias clínicas completas de estos enfermitos, han aparecido en la publicación n.° 21 de. E. P. R. A., desglosando para este trabajo los siguientes detalles de sus síntomas de comienzo.

7. H. T., 9 aos de edad. Noviembre de 1934. El Rabón. La enfermedad comenzó por el enrojecimiento de la *conjuntiva del ojo izquierdo.* En los días siguientes los párpados pusiéronse edematosos aumentando de tamaño paulatinamente hasta cerrar por completo la hendedura parpebral. Por la mañana aparecían los párpados adheridos por escasa secreción amarillenta.

Coincidió este estado ocular, con un gran decaimiento por parte del niño, falta de apetito y vómitos de los alimentos ingeridos durante el día.

Además relatan los padres que el niño durante la semana siguiente al comienzo de la enfermedad acusó un estado de pronunciada somnolencia, durmiendo casi continuamente día y noche.

Veinte días después del comienzo de la enfermedad tuvimos oportunidad de examinarlo, notando francamente hinchada la mitad izquierda de la cara, con borramiento de la natural depresión de la sien de

dicho lado, así como redondeados los relieves óseos de la misma. (Ver fotografía n.º 1).

Fig. 1. — H. T. Es posible apreciar el gran edema del ojo izquierdo así como la mácula del párpado inferior. Tambien se nota el edema de las partes vecinas

Fot. 2. — H. T. Desaparición del edema del ojo y de la cara. Un mes despues de la primera observación

El ojo izquierdo se presentaba con los párpados muy edematosos y reducida a la mitad la abertura parpebral. Este edema daba a la región una coloración ligeramente violácea y era elástico e indoloro por

palpación. En el párpado inferior se notaba una mancha rojiza, irregular, de medio centímetro de diámetro, que se hiciera visible cinco días antes. En los bordes parpebrales se encontraban restos de una escasa secreción amarillo oscuro, que según los padres era más abundante por la mañana.

Las conjuntivas parpebral y ocular estaban rojas y edematosas. La pupila regular, igual, central, reaccionando bien con la luz y la acomodación. El niño no acusa trastornos visuales. Nada de particular en córnea o iris. Buena motilidad ocular.

El ojo derecho tenía los párpados ligeramente edematosos, pero sólo notable después de un detenido examen. La conjuntiva estaba ligeramente inyectada. En iris y córnea nada de particular.

Las pupilas reacionaban bien con la luz y la acomodación.

En el ángulo de la mandíbula *del lado izquierdo* donde por la simple inspección era posible notar una deformación por hinchazón continuación de la de la cara, se palpaban *ganglios del tamaño de una avellana* (fig. 2) especialmente grandes, siendo *uno central.*

La sintomatología en este niño estaba completada con un estado febril discreto, pulso frecuente, bazo e hígado grandes, ligerísimo edema generalizado, aumento radiográfico del área cardíaca, habiéndose hallado *S. cruzi* en gota gruesa y siendo asimismo positiva la inoculación de sangre a rata blanca.

Seis días después de haberlo observado por pimera vez se notó la formación de una flictena en la mancha roja del párpado inferior izquierdo. Punzada, dió una pequeña cantidad de serosidad que extendida en una lámina y coloreada, demostró la presencia de numerosos leucocitos neutrófilos, así como de algunos grandes mononucleares. No se observaban parásitos ni microorganismos.

El edema del ojo izquierdo fué retrogradando paulatinamente, así como también fué desapareciendo la pequeña infiltración serosa del resto del cuerpo, infiltración que realmente sólo se hizo visible como anteriormente existente al tornarse más angulosas las formas del niño.

Un mes después de nuestra primera observación el edema había desaparecido casi por completo del ojo izquierdo, no quedando rastros del pequeño infiltrado subcutáneo en el resto del cuerpo. (Ver fotografía n.° 2).

8. N. R., 2 años de edad, Villa Guillermina. Noviembre de 1934. Una mañana amaneció el niño con una manchita roja en la sien izquierda. Sospechando los familiares en una picadura por vinchuca, buscaron en la cama del enfermito hallando una, llena de sangre. Durante el día la mancha roja aumentó de tamaño edematizándose las regiones vecinas. Al día siguiente el edema se extendía a los *párpados del ojo izquierdo*. En los días siguientes este edema aumentó al extremo de no permitirle al niño abrir el ojo. Dos días después fué consultado nuestro colega doctor Parma, quien sospechó estar en presencia de un caso de

Enfermedad de Chagas, diagnóstico que se confirmó al hallarse *S. cruzi* en la circulación.

Tres días más tarde tuvimos oportunidad de examinarlo hallando un intenso edema localizado en el *ojo izquierdo* y en las regiones vecinas *sin notar generalización al resto del organismo* (fig. 3).

Aquel ojo se presentaba cerrado bajo la acción del edema, que daba a los párpados una coloración rosa-violácea muy particular. Este edema era elástico e indoloro.

Inmediatamente por fuera del ángulo externo del ojo se presentaba una zona roja, elevada a modo de forúnculo, dura y un tanto dolorosa, sobre la cual la piel se descamaba en pequeñas costras, muy semejante a las que ya habíamos observado en el niño A. L., historia n.º 3.

Fot. 3. — N. R. (Fallecido) Gran edema del ojo izquierdo. Lesión de aspecto forunculosa por fuera del borde externo del ojo. Falta de edema en otras partes del cuerpo

Por otra parte, la inflamación edematosa se extendía al carrillo izquierdo y a la región temporal del mismo lado. No habiendo crepitación.

Los familiares informaban que por la mañana los párpados presentaban en los bordes escasa secreción amarillenta. Las conjuntivas parpebral y bulbar estaban rojas y edematosas, notándose un poco de quemosis. En iris y córnea no se observava nada de particular. *Se palpaba un ganglio del tamaño de un poroto grande* en la *región preauricular.*

Este niño presentaba además, temperatura febril, taquicardia hepateosplenomegalia, etc.

El edema no se generalizó permaneciendo localizado en el ojo izquierdo y sus vecindades, para decrecer luego paulatinamente. Dos semanas después de tenerlo en observación, el edema s había reducido a la mitad y el estado general del niño había mejorado aparentemente. En estas condiciones falleció súbitamente mientras jugaba. Detalles de la autopsia y estudio histopatológico de los órganos han sido publicados con el profesor Mazza en la publicación n.° 21 de M. E. P. R. A.

Fot. 4. — E. P. Gran edema del ojo derecho.
Falta de generalización al resto del cuerpo

9. E. P., 4 años de edad. Villa Guillermina. Diciembre de 1934. Este enfermito amaneció una mañana con el ojo derecho edematoso. Notándolo además la madre, febril y decaído.

Quince días después tuvimos oportunidad de examinarlo, relatándonos la madre que si bien el edema ocular había disminuído durante algunos días estaba en ese instante más o menos en las condiciones de cuando se inició. (Ver fotogarfía n.° 4).

El ojo derecho presentaba los párpados edematosos con la colora-
Este edema era elástico e indoloro, extendiéndose a las regiones vecinas de la cara, mejilla y pómulo derecho. También la base de la

nariz participaba del edema. La conjuntiva parpebral estaba roja y edematosa así como la bulbar. En córnea no se notaba nada de particular y tampoco en iris. La pupila normal reaccionaba con la luz y la acomodación. La motilidad ocular estaba conservada.

Era posible apreciar la existencia de *ganglios preauriculares, parotídeos y maxilares,* formando una verdadera cadena que bajaba hacia el cuello.

Este niño presentó *S. cruzi* en la circulación, así como hepatoesplenomegalia, temperatura febril, taquicardia, aumento radiográfico del área cardíaca, etc.

Fot. 5. — E. P. Desaparición del edema del ojo un mes despues de la primera observación

Actualmente el edema ocular ha desaparecido casi por completo sin haberse generalizado al cuerpo, aun cuando el niño continúa presentando síntomas internos de su infección parasitaria. (Ver fotografía n.° 5).

En *seis casos,* pues, ha quedado evidenciada la iniciación de la afección por *uno de los ojos.* (Observaciones n.° 1, 3, 6, 7, 8 y 9) y en dos más (Observaciones n.° 2 y 4) adquiere papel predominante el edema parpebral como una de las primeras manifestaciones anormales observadas por los familiares en los niños enfermos. En una sola observación este detalle no es apreciable (Observación n.° 5).

Precisemos ahora los caracteres de este nuevo síntoma, el cual puede describirse en la siguiente forma:

1.° Iniciación generalmente brusca por hinchazón de los párpados y de la conjuntiva de uno de los ojos;

2.° Edema elástico e indoloro dando a los párpados una coloración rosa-violácea bastante característica;

3.° Inyección y edema de la conjuntiva, que llega a veces a la quemosis;

4.° Extensión de este edema a las regiones vecinas de la cara del mismo lado, pudiendo generalizarse más tarde al opuesto y al resto del cuerpo;

5.° Falta de síntomas corneales o del interior del ojo, apreciables con el examen clínico;

6.° Escasa secreción conjuntival;

7.° Reacción ganglionar satélite del mismo lado de la inflamación ocular, localizada en los ganglios preauriculares, paratídeos o submaxilares;

8.° Frecuente hallazgo de un ganglio de mayor tamaño que los restantes;

9.° Lenta desaparición de la inflamación, que permanece a veces, localizada en el ojo enfermo.

Este importante síntoma que en nuestros últimos tres casos ha sido la única manifestación visible y llamativa de la enfermedad, recordamos haberlo observado en varias oportunidades durante nuestra práctica profesional en el Chaco, sin darle la importancia que ahora le asignamos por conocer su verdadera etiología.

Creemos, pues, que otro tanto ocurrirá con los colegas que profesan en el Norte del país y que tienen oportunidad de verlo, no dándole más valor que el que se le puede asignar a una conjuntivitis poco violenta, bien tolerada por el paciente y que desaparece sola al cabo de más o menos tiempo, sin que sospechen que se trata del comienzo de una enfermedad que podría muy bien ser mortal en corto plazo o por lo menos de un pronóstico reservado.

El edema generalizado a todo el cuerpo y del cual participan en importante forma los párpados, fué uno de los síntomas que Chagas describiera como básicos en la enfermedad que lleva su nombre, siendo casi inconcebible hablar de Enfermedad de Chagas sin edema.

Pero la iniciación de este proceso por uno de los ojos, sin que el edema se generalizara claramente al resto del cuerpo, no había sido mencionado por él ni por los investigadores que le siguieron en el estudio de la enfermedad en el Brasil, aunque en el país el profesor Mazza y colaboradores lo describen en varias de sus observaciones. De esta manera se explica que haya pasado tanto tiempo desapercibida la afección entre los médicos regionales, al ignorarse uno de sus síntomas más llamativos y que en forma tan fácil orienta el diagnóstico.

Pero no es solamente en base a nuestras observaciones clínicas que nos atrevemos a describir este síntoma, sino que ya existe en la experimentación de la enfermedad, una observación que lo abona suficientemente.

En efecto, durante nuestra estada en el Instituto Oswaldo Cruz de Rio de Janeiro el año pasado, tuvimos oportunidad de ver algunos enfermos cancerosos en los cuales Evandro Chagas practicaba experiencias de infección experimental de tripanosomiasis americana.

Entre ellos el único que adquirió la enfermedad fué el infectado por vía conjuntival, con deyecciones de *T. megista* conteniendo numerosas formas metacíclicas de *S. cruzi* (4).

En este enfermo se desarrolló una inflamación ocular en todo semejante a la por nosotros observada en los casos agudos a que nos hemos referido y hasta la adenitis satélite completaba el sindromo.

Al contrario, fueron negativos los intentos de infección efectuados en las mismas condiciones que en el caso anterior, pero usando la vía epidérmica como puerta de entrada, lo que condujo a E. Chagas a concluir que la capa córnea de la piel es suficiente para impedir la penetración de los parásitos contenidos en las deyecciones de los triatomas. E. Chagas nos ha comunicado por carta que también fueron negativos los intentos de infección humana haciendo succionar sujetos de experiencia por triatomas infectados.

Este hecho estaría de acuerdo con lo ya sostenido por Brumpt (4), quien acepta ser por contaminación con las deyecciones de los triatomas la infección del huésped vertebrado, tesis que debe ser la aceptada después de la brillante defensa de ella hecha por E. Días (5).

El hecho, pues, de haber conseguido E. Chagas la infección experimental del hombre, sólo por vía conjuntival, viene en apoyo de nuestra manera de pensar, de que la más común puerta de entrada de la Enfermedad de Chagas en el hombre, es la conjuntiva, aceptando el criterio de Brumpt y E. Días por contaminación con deyecciones de vinchucas infectadas.

Por otra parte, la experimentación ha demostrado desde los primeros ensayos de Brumpt, que la vía conjuntival es la que más fácilmente permite obtener la infección de los animales de laboratorio (Brumpt, Mayer y Rocha Lima, Neiva, Torres, citados por E. Días), habiendo E. Días mismo, comprobado esta facilidad de conseguir la infección. Niño obtuvo también una infección mortal de cobayo, por esta vía (6).

No obstante lo que dejamos expuesto, es evidente que no en todos los casos de Enfermedad de Chagas, es posible referir el comienzo de la misma a una lesión ocular que sindique claramente esta puerta de entrada, quedando la posibilidad que en una menor cantidad de casos, puedan serlo las mucosas nasal o bucal o aún mismo la delicada piel de los párpados de los niños, cuya capa córnea no puede compararse con la que protege las pieles adultas.

Esta hipótesis de ser la conjuntiva la más frecuente puerta de entrada de la Enfermedad de Chagas, permitiría explicar un hecho que desde el comienzo de nuestros estudios en esta infección nos resultaba

chocante y contradictodio. Nos referimos al elevado porciento de vinchucas infectadas, comparado con la relativa poca cantidad de casos de la enfermedad que es posible identificar.

Alcanzando el índice de infección de las vinchucas en ciertas zonas de la Argentina el 50, 60 y aún más por ciento de los ejemplares capturados, insectos que pululan especialmente durante el verano en los ranchos de nuestros campos, chupando noche tras noche a los habitantes de los mismos, era lógico pensar que todos o la gran mayoría de ellos en algún instante de su vida deberían de haber sufrido la infección tripanósica, pues al ser picado en una oportunidad o en otra, deberían exponer su piel al contacto de las deyeccions contaminantes, que el insecto elimina siempre al alimentarse.

No dándose este caso de una generalización extraordinaria de la enfermedad de los habitantes de nuestros campos, habíamos pensado que debía haber algún factor que condicionara la capacidad de producir la infección del hombre por los insectos hematófagos y al hallar entre nuestros enfermitos como síntoma inicial predominante la *conjuntivitis esquizotripanósica unilateral*, pensamos que en la puerta de entrada reside este factor.

Con los ojos cerrados durante el sueño, no es fácil que las deyecciones lleguen al interior del ojo en las víctimas del ataque de las vinchucas, siendo necesarios una serie de hechos coincidentes para que esto ocurra.

En la dificultad para que las formas infectantes del *S. cruzi* encuentren la vía conjuntival y penetrar al organismo, estaría, pues, la limitación natural para una mayor difusión de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

(1) Romaña, Cecilio, *Comprobación de formas agudas de tripanosomiasis americana en el Chaco austral y santafecino.* Publicación n.° 14 de la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina. I. Imprneta de la Universidad de Buenos Aires, 1934.

(2) Mazza, Salvador y Romaña, Cecilio, *Otro caso de forma aguda de Chagas en el norte santafecino.* Publicación n.° 15 de la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina. II. Imprenta de la Universidad de Buenos Aires, 1934.

(3) Chagas, Evandro, *Infección expérimentale de l'hamme par le ''Trypanosoma cruzi''.* (Note n.° 4, presentée à la Société Brasilienne de Biologie, le 29 Août de 1934.

(4) Brumpt, E., 1912. *Pénétration du ''Schizotripanum cruzi à travers la muqueuse oculaire saine,* en *Bull. Sco. Path. Ex.*, vol. 5, p. 727.

(5) Días, Emmanuel, *Estudios sobre o ''Schizatipanum cruzi''*, en *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,* vol 28, p. 1, 1934.

(6) Niño, Flavio L., *Contribución al estudio de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana.* Misión de Estudios de Patología Regional Argentina. Imprenta de la Universidad de Buenos Aires, 1929.

Comentários

Sinal de Romaña e o Diagnóstico de Doença de Chagas

Alejandro Marcel Hasslocher Moreno
Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil
Laboratório de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz

Na década de 30 do último século, o médico dr. Cecílio Romaña, após algumas missões no interior da Argentina, identifica um sinal clínico que não fora associado com a doença de Chagas até então. A partir desse momento, percebe-se que a maioria dos casos agudos de doença de Chagas, com manifestação clínica aparente, tem como manifestação inicial o sinal descrito por Romaña. Este sinal fora descrito como uma conjuntivite, que cursava com reduzido acometimento do olho e córnea, mas grande edema e rubor em uma das pálpebras e lado da face, indolor e pruriginoso, com linfoadenomegalia satélite. O edema, que poderia se generalizar e deformar o rosto, permanecia por semanas ou meses.

Este sinal apresenta um valor preditivo para identificação da doença de Chaga bastante elevado, cerca de 11 vezes maior do que para aqueles que não o têm. Porém, com as modificações dos cenários epidemiológicos da transmissão da doença de Chagas, a via vetorial de transmissão perdeu sua importância e outras vias, como a oral, a transfusional, a vertical e o transplante de órgãos, passaram a ser relativamente mais freqüentes. Nessas outras vias de transmissão, a conjuntiva deixa de ser uma via de entrada preferencial, e assim, apesar de seu valor histórico, seu valor clínico perde importância progressivamente.

No artigo aqui comentado, o dr. Romaña sinaliza as contribuições de outros pesquisadores, relatando trabalhos de Emmanuel Dias e Evandro Chagas, no que tange ao mecanismo de inoculação do parasito causado pelo contato com as fezes do barbeiro, e não pela picada em si do triatomíneo. Analisa também as razões pelas quais a conjuntiva seria a principal porta de entrada quando comparada com a pele propriamente dita, justificando o acometimento preferencial de crianças em função da "delicada pele" da pálpebra infantil.

SOBRE O ORIGINAL

Nos anos 1930, médicos argentinos atuando em áreas rurais no interior da Argentina para estudar a doença de Chagas geraram uma série de relatórios, publicados pela Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (Mepra), que incrementaram o conhecimento sobre a doença de Chagas. Dentre esses, o médico dr. Cecílio Romaña publicou em 1935 um trabalho de valor histórico.

Até então, acreditava-se que a porta de entrada mais freqüente do *Trypanosoma cruzi* era o local da picada, a qual posteriormente era contaminada pelas fezes do inseto, seguindo a infecção do hospedeiro. Nesse relatório, Romaña discute uma questão premente: por que em locais onde a prevalência de infecção entre triatomíneos capturados chegava a 50%, 60%, ou mais, identificavam-se tão poucos casos de doença de Chagas aguda?

Romaña argumenta sobre esse problema com uma percepção de sua experiência de sucessivas missões no interior da Argentina. Informa que não se identificava, em seu tempo, grande número de infecções agudas porque esperava-se encontrar, nos pacientes, achados clínicos semelhantes aos descritos por Carlos Chagas. Ele escreve, por exemplo, que achados descritos como freqüentes, caso da tireoidite, não eram identificados em seus pacientes (Romaña, 1935).

No mesmo texto, de forma bastante clara, quase romantizada, e de agradável leitura, o médico relata uma série de nove casos infantis por ele examinados, descrevendo a seqüência de achados clínicos e seus respectivos desfechos. Ao final dos relatos, Romaña não poderia concluir outra coisa senão que havia um sinal de infecção aguda por *T. cruzi* que até então não era relacionado com a doença de Chagas. Em seis casos, os sinais de infecção se iniciaram pelo acometimento de um dos olhos; em dois, apesar de não serem o primeiro sintoma, foram clinicamente predominantes; em apenas um os achados em um dos olhos foram clinicamente pouco relevantes. Desses nove casos, todos com sinal de Romaña, três evoluíram a óbito, dois em função de meningoencefalite e um apresentando morte súbita, provavelmente por miocardite.

O próprio Romaña descreve o sinal como uma conjuntivite de início abrupto, que provavelmente se deve ao carreamento das fezes contaminadas do triatomíneo pelas mãos do próprio paciente, da seguinte maneira:

- Inchaço de início brusco de pálpebras e conjuntiva de um dos olhos.
- Edema elástico e indolor dando às pálpebras uma coloração rosa-violácea bastante característica.
- Congestão e edema da conjuntiva que às vezes evoluem para equimose.
- Extensão do edema às regiões vizinhas do mesmo lado do rosto, podendo generalizar-se ao lado oposto e ao resto do corpo.
- Ausência de sintomas da córnea e do olho propriamente dito.
- Secreção conjuntival escassa.
- Linfoadenomegalia satélite homolateral submandibular, pré-auricular ou parotídea.
- Freqüente achado de um linfonodo de maior tamanho que o restante.
- Lenta redução dos achados inflamatórios, que às vezes permanecem localizados no olho inicial por semanas ou meses.

Após essa percepção, mais casos de doença de Chagas foram identificados e verificou-se que os sinais já conhecidos de doença aguda, como febre de intensidade e duração variáveis, hepatomegalia, esplenomegalia e linfonodomegalia generalizada, seguiam-se à conjuntivite.

A doença de Chagas aguda por transmissão vetorial na maioria das vezes é assintomática e passa despercebida (MS/SVA, 2004). Mesmo assim, o sinal de Romaña é o único sinal que tem valor preditivo positivo independente suficientemente grande para incrementar a probabilidade da correta identificação da doença de Chagas aguda. A probabilidade de um paciente ser identificado com doença de Chagas é cerca de 11 vezes maior quando apresenta o sinal de Romaña do que quando não o apresenta. Outros sinais clássicos, como hepatomegalia e esplenomegalia, edema e febre, também têm um valor preditivo considerável, mas quando combinados dois a dois (Muynck, 1986).

NOS TEMPOS ATUAIS

A partir da década de 1970, o controle de vetores começa a modificar substancialmente a epidemiologia da doença (Moncayo, 2003; WHO Expert Committee..., 2002; MS/SVA, 2005a). Com a redução considerável ou erradicação do vetor em diversas localidades do continente americano, outras vias de transmissão – como a oral (MS/SVA, 2005a, 2007; Nery-Guimarães *et al.*, 1968; Pereira *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2008, 2009); a transfusional, principalmente em países não latinos (Stramer *et al.*, 2007), o transplante de órgãos e a transmissão vertical, em determinadas regiões – começam a preocupar tanto em relação ao potencial de disseminação da doença como ao seu controle. Esses pacientes, vítimas dessas vias alternativas de infecção, apresentam um quadro clínico diferente do classicamente descrito na via vetorial (MS/SVA, 2005a; Nery-Guimarães *et al.*, 1968; Pinto *et al.*, 2008, 2009; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1990), e assim o sinal de Romaña perde progressivamente o seu valor diagnóstico na infecção aguda atual.

De uma série de casos relatados na região amazônica nas décadas de 80 e 90, sinais de porta de entrada como o sinal de Romaña se apresentaram em pouquíssimos casos e de forma duvidosa (Pinto *et al.*, 2008), o que foi diferente do esperado caso a transmissão tivesse sido vetorial. Outros surtos de doença de Chagas que foram relacionados com a via oral de transmissão, desde o de Teutônia, no Rio Grande do Sul (Nery-Guimarães *et al.*, 1968), até o de Caracas, na Venezuela (Pereira *et al.*, 2009), também não apresentaram os sinais de porta de entrada como manifestação clínica predominante.

Outro aspecto interessante é o fato de que no artigo original identificam-se somente crianças apresentando o sinal de Romaña associado ao quadro de infecção aguda, enquanto os surtos de Chagas agudo, ocasionados por ingestão de alimento contaminado com o parasito, atualmente acometem grupos familiares, envolvendo indistintamente crianças e adultos.

Dentro de uma racionalidade de diagnóstico, seria de se esperar, em um paciente que está em investigação para doença de Chagas já na fase crônica, que este pudesse referir um passado de algum sinal ou sintoma potencialmente relacionado com a forma aguda. No entanto, além de os sinais da fase aguda serem escassos (MS/SVA, 2004), devido a características clínicas da doença, a investigação diagnóstica na fase crônica acontece geralmente de vinte a cinqüenta anos depois da infecção inicial. Assim, não é possível saber o valor do relato do paciente sobre o sinal de Romaña no passado durante a investigação da doença na fase cônica, devido ao lapso e à imprecisão da informação dada pelos pacientes.

Da mesma forma, outras vias de infecção que não a vetorial – como a transfusional, através de transplante de órgãos, ou a vertical – não apresentam a mesma porta de entrada, e por isso não apresentam sinais clínicos como os classicamente descritos para a forma aguda transmitida pelo vetor. As manifestações clínicas irão variar de acordo com a situação.

Atualmente, um caso suspeito de doença de Chagas aguda é definido da seguinte forma (MS/SVA, 2005a, 2005b, 2008): paciente com quadro febril prolongado (mais de sete dias) e que apresente esplenomegalia ou acometimento cardíaco agudo, residente ou visitante de área onde haja ocorrência de triatomíneos, que tenha recebido transfusão de hemoderivados ou transplante de órgãos, ou que tenha ingerido alimento suspeito de contaminação; todo paciente residente em área caracterizada como provavelmente infestada por triatomíneo e que apresente sinal de Romaña ou chagoma de inoculação; todo paciente residente em área de transmissão ativa da doença e que apresente febre com mais de uma semana de duração; todo paciente, com febre, que tenha sido submetido à transfusão de sangue ou hemoderivados sem o devido controle de qualidade; todo paciente com clínica sugestiva e com exame parasitológico direto negativo ou não realizado. Portanto, em nenhuma dessas condições o sinal de Romaña é considerado para a suspeita diagnóstica de doença de Chagas em sua forma aguda.

REFERÊNCIAS

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Doença de Chagas Aguda: manual prático de subsídio à notificação obrigatória no Sinan*. Brasília, 2004. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_chagas.pdf>. Acesso em: 26 maio 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian consensus on Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, supl. 3: 7-29, 2005a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Brasília, 2005b. Disponível em: <189.28.128.100/portal/arquivos/pdf/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf>. Acesso em: 25 maio 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Nota Técnica: doença de Chagas aguda por transmissão oral*. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2609.pdf>. Acesso em: 27 maio 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso*. Brasília, 2008. Disponível em: <189.28.128.100/portal/arquivos/pdf/guia_bolso_7_edicao_web.pdf>. Acesso em: 25 maio 2009.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(5): 577-591, 2003.

MUYNCK, A. Predictive value of specific signs and symptoms for the diagnosis of acute Chagas' disease in children. *Journal of Tropical Pediatrics*, 32(5): 230-233, 1986.

NERY-GUIMARÃES, F. *et al.* Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). *O Hospital*, 73: 1.767-1.804, 1968.

PEREIRA, K. S. *et al.* Chagas' disease as a foodborne illness. *Journal of Food Protection*, 72(2): 441-446, 2009.

PINTO, A. Y. D. N. *et al.* Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(6): 602-614, 2008.

PINTO, A. Y. D. N. *et al.* Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 25(1): 77-83, 2009.

ROMAÑA, C. C. Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas: la conjutivitis esquizotrypanósica unilateral. *Misión de Estudios de Patología Regional Argentina*, 22: 16-28, 1935.

SHIKANAI-YASUDA, M. *et al.* Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 32(1), 1990. Disponível em: <www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036-51990000100004&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso em: 27 maio 2009.

STRAMER, S. L. *et al.* Blood donor screening for Chagas disease, United States, 2006-2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 56(7): 141-143, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. *Control of Chagas Eisease: second report of WHO Expert Committee.* Geneva: WHO, 2002. Disponível em: <whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf>. Acesso em: 27 maio 2009.

Revisitando a Descoberta do Sinal de Romaña

Silvana Maria Elói-Santos
Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração
Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz
Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina/UFMG

Olindo Assis Martins-Filho
Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração
Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz

CONTEXTUALIZANDO O MANUSCRITO E SUA RELEVÂNCIA

Em 1935, a publicação número 22 da Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (Mepra), *Investigaciones sobre la Enfermedad de Chagas*, trazia quatro artigos de importância. Três, de autoria de Salvador Mazza, enfocavam novos achados epidemiológico-parasitológicos da infecção. O quarto, de autoria de Cecilio Romaña, divulgava um achado clínico freqüente nos casos de forma aguda da infecção humana pelo *Schizotrypanum cruzi* (*Trypanosoma cruzi*), diagnosticados por ele, no Chaco argentino: a então chamada "conjuntivite esquizotripanósica unilateral".

Cecilio Felix Romaña Berón de Astrada (1899-1997), personagem fundamental da epopéia chagaseana, mereceu reconhecimento internacional e um artigo biográfico póstumo esmerado, publicado por João Carlos Pinto Dias (Dias, 1997). Ainda jovem, associou-se a Salvador Mazza em suas atividades na Mepra, na cidade argentina de Jujuy, em 1931, época em que se testemunhava, simultaneamente, o período de grande endemicidade da doença de Chagas, na Argentina, e a fase de descrédito e desinteresse nas pesquisas sobre a enfermidade,

no Brasil. Era um tempo distinto daquele de Carlos Chagas, em um novo cenário – o Chaco argentino –, de intensos estudos, considerado por alguns como a "era da redescoberta" da doença de Chagas. Nesse contexto histórico-geográfico particular, o astuto médico, com base na observação de nove casos da forma aguda, apresenta o artigo de autoria única: "Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas: la conjuntivitis esquizotripanósica unilateral (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad)". Nele, o autor descreve a manifestação clínica que seria a mais indicativa da infecção tripanossômica aguda: um edema elástico, indolor, unilateral, bipalpebral, cor rósea-violácea, com hiperemia e edema de conjuntiva, com propagação para regiões vizinhas e escassa secreção conjuntival, associado à reação ganglionar satélite.

Publicação simples do ponto de vista experimental, mas preciosa do ponto de vista clínico. Sua apresentação na IX Reunião da Mepra, a primeira grande reunião internacional sobre doença de Chagas, realizada por Salvador Mazza em homenagem póstuma a Carlos Chagas, foi cercada de calorosos debates. Debates que ainda persistem em tempos atuais (Carneiro, 1963; Delaporte, 1995, 1997).

Romaña já relatara o edema bipalpebral em casos agudos, em comunicações prévias, mas ainda assim Salvador Mazza contestou a originalidade do achado, uma vez que Carlos Chagas, e ele próprio, já o haviam descrito. Tal oposição se avigorou quando a delegação brasileira, representada por Emmanuel Dias e Evandro Chagas, propôs que essas lesões de porta de entrada fossem nomeadas por "sinal de Romaña" (Sierra-Iglesias, 1990).

IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO DA PUBLICAÇÃO

A despeito da polêmica sobre a primazia da descrição, é notório que essa publicação foi um marco na ampliação do conhecimento sobre a infecção, por ter possibilitado o aumento das notificações de casos de doença de Chagas. O sinal de Romaña assumiu, então, o papel de localizador de casos agudos, por ser facilmente diagnosticado. Poucos anos após sua divulgação, em 1939, Emmanuel Dias publicava o artigo "O sinal de Romaña e sua influência na evolução dos conhecimentos sobre a moléstia de Chagas". Nele, Dias relatava que até 25 anos após a descoberta da doença de Chagas, apenas 36 casos haviam sido diagnosticados fora do Brasil e "a mais das vezes por acaso, dando margem a que se fixasse a noção comodista da benignidade ou da esporadicidade da infecção". Entretanto, após a descrição e plena divulgação do complexo oftalmoganglionar, ocorre inversão da ordem investigativa: a pesquisa etiológica passa a ser orientada pela suspeita clínica de valor diagnóstico. E em apenas dez meses, de agosto de 1936 a junho de 1937, mais de 139 casos foram diagnosticados na Argentina. O reconhecimento da forma aguda deixou de ser privilégio de especialistas e passou ao alcance de qualquer médico, e até de leigos. O número crescente de novas notificações em vários outros países demonstrou a importância continental da infecção, já proclamada por Carlos Chagas (Dias, 1939).

De importância para o desenvolvimento dos estudos no Brasil, ressalta-se que o foco da infecção na cidade de Bambuí, Minas Gerais, foi encontrado a partir da identificação de casos apresentando sinal de Romaña, pelo dr. Amilcar Vianna Martins, do Instituto Ezequiel Dias, em outubro de 1940. Martins publicou com alguns colaboradores trabalho no qual descreveu 25 casos de doença de Chagas em fase aguda no oeste de Minas Gerais. Esse número de pacientes era maior do que o número total de casos agudos conhecidos até então, e sua descrição contribuiu decisivamente para a implantação do Centro de Estudos de Doença

de Chagas em Bambuí, instituição que se tornaria reconhecida por seus estudos clínicos e epidemiológicos da moléstia, como apresentado pelo dr. Zigman Brener na página eletrônica sobre Vianna Martins (www.icam.org.br).

Segundo João Carlos Pinto Dias, desde os estudos realizados em Lassance, era a primeira vez que um número expressivo de portadores da doença era identificado no país (Dias, Prata & Coura, 2008). A doença de Chagas deixou de ser uma doença rara, pois pouco diagnosticada, e se estabeleceu como uma das principais pandemias da América Latina.

IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS DE ROMAÑA NA IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS DE TRANSMISSÃO VETORIAL

Nos estudos iniciais, em 1909, Carlos Chagas acreditava que a tripanossomíase americana era transmitida ao homem principalmente pela picada do inseto. Apesar de Magarinos Torres ter, em 1915, demonstrado experimentalmente tal possibilidade, essa transmissão vetorial foi sujeita a numerosas controvérsias, em virtude da raridade do encontro de tais formas nas glândulas salivares do inseto vetor. Além disso, em 1934, Evandro Chagas, trabalhando em experimentação humana, não conseguiu infectar nenhum voluntário por meio de picadas repetidas de triatomíneos intensamente infectados, contendo abundantes formas de *T. cruzi* no tubo digestivo (Chagas, 1935).

Somente a partir dos achados de Brumpt (1912) a transmissão via deposição de fezes contaminadas, contendo as formas metacíclicas, em superfície da pele e das mucosas, passou a ser considerada. Evandro Chagas, experimentando ainda no homem, também não conseguiu confirmar infecção por meio da deposição de material fecal infectante na superfície da pele intacta. Mas comprovou a penetração das formas infectantes através da mucosa, depositando fezes contaminadas do transmissor na conjuntiva de um voluntário, com posterior observação, após alguns dias, da formação local de processo inflamatório intenso e do aparecimento da doença com todos os caracteres evolutivos (Chagas, 1935). Essa importante observação mereceu citação no artigo de Romaña.

Assim, a contribuição do artigo vai muito além da descrição do complexo oftalmoganglionar. O autor apresentou a proposição de que o mecanismo de transmissão vetorial da doença de Chagas pela via conjuntival constitui importante porta de entrada para o *T. cruzi*.

Segundo Emmanuel Dias (1936: 347), Romaña também havia observado que "no caso de ser cutânea a porta de entrada das infecções humanas (...) também haveria um sinal aparente caracterizado por lesão endurecida, arredondada, de 4 cm de diâmetro, pouco dolorosa, situada na bochecha – segundo comunicação epistolar do pesquisador". Embora existam controvérsias acerca da autoria da descrição do chagoma de inoculação, o relato de Dias sugere que Romaña já estaria atento a tal mecanismo de transmissão vetorial.

ESPECIFICIDADE DO SINAL DE ROMAÑA

A descrição de Romaña era indubitavelmente aquela que valorizava o complexo oftalmoganglionar como de grande especificidade para o diagnóstico clínico da forma aguda da doença de Chagas. Entretanto, sua especificidade era discutida desde seu relato. Embora característico, o sinal de Romaña não poderia ser considerado patognomônico, especialmente em regiões com menor densidade de triatomíneos infectados. Essa consideração foi apresentada de forma bastante elegante por Emmanuel Dias (1936: 346) em sua descrição:

numa criança apresentando o sinal de Romaña, ao lado de sintomas gerais de infecção, e habitando uma cafua infestada por barbeiros, é um diagnóstico de enorme probabilidade de forma aguda da doença de Chagas, tanto mais se for constatado o parasitismo dos barbeiros e se houver referência à recente picada ao nível do rosto do paciente.

Assim fica claro que o valor preditivo positivo do sinal de Romaña seria maior quando associado a outras variáveis clínicas e epidemiológicas, considerando-se que várias outras situações clínicas, oculares ou perioculares, podem reproduzir o quadro do edema bipalpebral unilateral. Dentre as situações clínicas que mais mimetizam o sinal de Romaña estão o abscesso local, a conjuntivite aguda unilateral, a celulite orbitária, o traumatismo, os hordéolos e, especialmente, a simples picada do triatomíneo, mesmo não infectado, em paciente com hipersensibilidade (Amato Neto, Yasuda & Amato, 1997; Dias & Macedo, 2006; Pellegrino & Rezende, 1953).

IMPORTÂNCIA DO SINAL DE ROMAÑA NA ATUALIDADE

A freqüência do encontro do sinal de Romaña sempre foi muito variável. Em análise de casuísticas de doença de Chagas do Brasil e na Argentina, João Carlos Pinto Dias, em seu extenso levantamento, verificou percentuais de freqüência entre 12,5 e 95,5 (Dias, 1982).

Sendo o sinal de Romaña um importante indicador da transmissão vetorial, seu encontro na atualidade é fortuito em regiões de baixa endemicidade, mas ainda relatado em regiões com elevada transmissão vetorial. Em estudos conduzidos de janeiro de 1989 a dezembro de 1996, na cidade de Barinas, área endêmica na Venezuela, Parada e colaboradores encontraram 58 casos agudos de doença de Chagas. O sinal de Romaña estava presente em 40% dos casos (23/58), associado ou não a outros sinais, como febre, insuficiência cardíaca ou hepatomegalia (Parada *et al.*, 1997).

Em Cochabamba, Bolívia, estudo realizado entre 1995 e 1999 avaliou a demografia da doença de Chagas na região, mediante a avaliação de crianças de 5 a 13 anos de idade (n=2.221). Apenas 13 (0,6%) relataram ocorrência de sinal de Romaña em sua história pregressa (Medrano-Mercado *et al.*, 2008). Atualmente, casos esporádicos ainda são encontrados (Medrano-Mercado, comunicação pessoal, 2009).

Na Colômbia, em dez casos notificados ao Grupo de Parasitologia do Instituto Nacional de Saúde entre 2002 e 2005, os sinais de porta de entrada não foram freqüentes e apenas um paciente apresentou possível sinal de Romaña (Nicholls *et al.*, 2007).

Na região amazônica brasileira, em 2008, Pinto e colaboradores estudaram 233 casos de fase aguda da doença de Chagas, oriundos do Pará, Amapá e Maranhão, observados no período de 1988 a 2005. Esses autores relatam que sinais de porta de entrada do parasita foram raramente identificados, tendo sido observados de modo impreciso em seis pacientes, um dos quais apresentou provável sinal de Romaña enquanto os demais apresentaram lesões sugestivas de chagoma de inoculação (Pinto *et al.*, 2008).

Certamente, a baixa notificação do sinal do Romaña é primariamente devida à redução da densidade de triatomíneos infectados no espaço peridomiciliar em conseqüência dos programas de controle da transmissão vetorial aplicados nos países da América Latina. Entretanto, não deve ser menosprezado o desconhecimento atual, por parte de profissionais da saúde e também da população, dos mecanismos de transmissão vetorial da doença de Chagas. É possível que o sucesso das campanhas de controle de triatomíneos tenha mitigado da lembrança da população a imagem de flagelo da doença de Chagas.

Nesse contexto, a iniciativa da Fundação Oswaldo Cruz de resgatar registros clássicos relacionados aos achados científicos que marcaram a construção do conhecimento acerca da doença de Chagas representa uma oportunidade de revolver conhecimentos de um profícuo tempo, agora já secular. São memórias de um tempo passado, mas que ainda não viu o fim. Vêm novos conhecimentos do tempo contemporâneo, que recicla, retorna, reabastece ao revisitar, reconhecer e redivulgar as descobertas de Cecilio Romaña.

REFERÊNCIAS

AMATO NETO, V.; YASUDA, M. A. S. & AMATO, V. S. Doença de Chagas aguda. In: DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. (Orgs.). *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

BRENER, Z. *Biografia Professor Amilcar Vianna Martins (1907-1990)*. Disponível em: <http://www.icam.org.br/amilcar/depoimento03.html>. Acesso em: 29 maio 2009.

BRUMPT, E. Pénétration du *Schizotrypanum cruzi* à travers la muquese oculaire saine. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales*, 5: 723-724, 1912.

CARNEIRO, M. *História da Doença de Chagas*. Curitiba: s. n., 1963.

CHAGAS, E. Súmula dos conhecimentos atuais sobre a tripanossomíase americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 30(3): 387-416, 1935.

DELAPORTE, F. Chagas, a lógica e a descoberta. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, 1(2): 39-53, 1994-1995.

DELAPORTE, F. Romana's sign. *Journal of the History of Biology*, 30: 357-366, 1997.

DIAS, E. O sinal de Romaña e os novos progressos no estudo da doença de Chagas. *Folha Médica*, 17: 345-347, 1936.

DIAS, E. O sinal de Romaña e sua influência na evolução dos conhecimentos sobre a moléstia de Chagas. *Brasil Médico*, 42, ano LIII: 5-10, 1939.

DIAS, J. C. P. *Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil: estudo-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 a 1982*, 1982. Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.

DIAS, J. C. P. Cecilio Romaña, o sinal de Romaña e a doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30: 407-413, 1997.

DIAS, J. C. P. & MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, J. R. (Ed.). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

DIAS, J. C. P.; PRATA, A. & COURA, J. R. Emmanuel Dias: o principal artífice do combate à doença de Chagas nas Américas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41: 502-504, 2008.

MEDRANO-MERCADO, N. *et al*. Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 423-430, 2008.

NICHOLLS, R. S. *et al*. Enfermedad de Chagas aguda en Colombia, una entidad poco sospechada: informe de 10 casos presentados en el período 2002 a 2005. *Biomédica*, 27: 8-17, 2007.

PARADA, H. *et al*. Cardiac involvment is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical parasitological and histopathological study. *International Journal of Cardiology*, 60: 49-54, 1997.

PELLEGRINO, J. & REZENDE, C. L. A doença de Chagas na infância. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 5: 558-610, 1953.

PINTO, A. Y. N. *et al*. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41: 602-614, 2008.

SIERRA-IGLESIAS, J. P. *Salvador Mazza, su Vida y su Obra: redescubridor de la enfermedad de Chagas.* San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy, 1990.

TORRES, M. Alguns fatos que interessam à epidemiologia da moléstia de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 7: 120, 1915.

AMILCAR VIANA MARTINS, VALDEMAR VERSIANI & ANTONIO A. TUPINAMBÁ

Sobre 25 casos agudos de moléstia de Chagas observados em Minas Gerais.

Separata de Memórias do Instituto Biológico Ezequiel Dias, 3-4: 1-47, 1939-1940.

Amilcar Viana Martins (1907-1990)

Médico nascido em Minas Gerais, chefiou o Serviço de Endemias Rurais da Secretaria de Saúde do Estado e foi diretor do Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu). Dirigiu o Instituto Oswaldo Cruz de 1958 a 1960. A descrição de 25 casos agudos da doença de Chagas em Bambuí constituiu um marco decisivo para a afirmação efetiva da moléstia como importante problema de saúde pública para o Brasil e para a América Latina.

Valdemar Versiani dos Anjos (1901-1980)

Médico e escritor bissexto, mineiro, trabalhou com Amilcar Viana Martins e Antonio Augusto Tupinambá na descrição de 25 casos agudos da doença de Chagas em Bambuí.

Antonio Augusto Tupinambá (s.d.)

Médico mineiro, foi professor da Universidade Federal de Minas Gerais e trabalhou com Amilcar Viana Martins e Valdemar Versiani dos Anjos na descrição dos 25 casos agudos da doença de Chagas em Bambuí. Destacou-se ainda pela descoberta de uma nova espécie de barbeiro, a *Ponstrongilus tupinambai*.

SEPARATA DAS
"MEMORIAS DO INSTITUTO EZEQUIEL DIAS"
ANOS 1939 E 1940 - TOMOS III e IV

Sobre 25 casos agudos de molestia de Chagas observados em Minas Gerais

I — Introdução e comentarios, pelos Drs. A. Viana Martins, Valdemar Versiani e Antonio A. Tupinambá.

II — Observações, pelos Drs. Antonio Torres Sobrinho, Antonio Torres, José Elias Lasmar, Ananias Ataliba Teixeira, A. Viana Martins, Valdemar Versiani e Antonio A. Tupinambá.

Trabalho do Instituto Biologico Ezequiel Dias (Diretor: Prof. Otavio Magalhães) e do Serviço de Estudos das Grandes Endemias do Instituto Osvaldo Cruz. (Superintendente interino: Prof. Carlos Chagas Filho.) - Entregue para publicação em março de 1942

SOBRE 25 CASOS AGUDOS DE MOLESTIA DE CHAGAS OBSERVADOS EM MINAS GERAIS

I — *Introdução e comentarios, pelos Drs. A. Viana Martins, Valdemar Versiani e Antonio A. Tupinambá.*

II — *Observações, pelos Drs. Antonio Torres Sobrinho, Antonio Torres, José Elias Lasmar, Ananias Ataliba Teixeira, A. Viana Martins, Valdemar Versiani e Antonio A. Tupinambá.*

Trabalho do Instituto Biologico Ezequiel Dias (Diretor: Prof Otavio Magalhães) e do Serviço de Estudos das Grandes Endemias do Instituto Osvaldo Cruz. (Superintendente interino: Prof. Carlos Chagas Filho).

Em trabalho anterior, publicano no n.º 51, ano LIX, Dezembro de 1940, do "Brasil-Médico", Martins e Tupinambá descreveram resumidamente dois casos agudos da molestia de Chagas, observados em Minas Gerais.

Em nota áquele trabalho, foi dito que mais tres casos haviam sido registrados nos municipios de Bambuí e Luz, na zona Oeste do Estado de Minas e que seriam oportunamente dados a publicidade.

Desde então se têm multiplicado esses casos, que constituem o objeto da presente publicação, na qual englobamos todas as observações por nós registradas, até Dezembro de 1941.

Vem isso provar sobejamente a afirmativa, tantas vezes repetida, de que casos agudos da molestia de Chagas ocorrem em elevado número em grande parte do território nacional, mas deixam de ser diagnosticados exclusivamente porque os clínicos do interior, a cujas mãos vão eles ter, na sua quasi totalidade, não têm sido suficientemente esclarecidos sobre o assunto.

Hoje, felizmente, graças antes de tudo ao gigantesco trabalho executado pelos pesquizadores argentinos, com Salvador Mazza à frente, vêm se processando salutar reação. Estudos sobre o tripanosomose americana estão sendo feitos, não só no Instituto Oswaldo Cruz, onde, aliás, nunca sofreram interrupção, como ainda no Rio Grande do Sul, São Paulo, Goiás, Pará, Minas Gerais, Pernambuco, Baía, etc.. Já começa a molestia a chamar novamente a atenção dos poderes publicos e a entrar nas cogitações dos clinicos, principalmente do interior.

Consideramos urgente mostrar a verdadeira importancia da molestia de Chagas, provar objetivamente, por meio de

observações numerosas, que não se trata de molestia rara, curiosidade nosologica, que ataca esporadicamente sertanejos de baixo nivel economico, residentes em regiões distantes e pouco produtivas. Para isso não basta fazer calculos teoricos sobre o numero de cafuas existentes no Brasil e sobre a percentagem de seus habitantes que devem estar infetados.

E' preciso demonstrar a existencia do inseto transmissor infetado na maior parte do territorio nacional; verificar a percentagem de individuos doentes, com a forma cronica, em diferentes regiões; esclarecer os clinicos, afim de que sejam diagnosticados e devidamente registrados os casos agudos, no maior numero possivel. E' necessario divulgar amplamente que o diagnostico da molestia, pelo menos na sua fase aguda, não é apanagio de laboratoristas, pois que ela apresenta sintomatologia um tanto polimorfa talvez, mas com elementos seguros e constantes, que permitem perfeitamente fazer o diagnostico clinico, que só necessitará do laboratorio para sua confirmação. E então agora, com as esperanças que surgem quanto à terapeutica, esse diagnostico se impõe a todos os clinicos realmente bem intencionados.

E' esse o programa que em Minas Gerais vem sendo executado, com a cooperação e o apoio do governo estadual, pelo Serviço de Estudos das Grandes Endemias, do Instituto Oswaldo Cruz. Os resultados obtidos têm sido absolutamente animadores. Na zona mais trabalhada — o municipio de Bambuí — já o diagnostico clinico e mesmo a sua confirmação pelas provas de laboratorio, é feito com a maior segurança pelos medicos locais, o mesmo acontecendo em outras partes do Estado como, por exemplo, São Gotardo, de onde registramos um caso que veio às nossas mãos apenas para confirmação, já com o diagnostico firmado.

Os casos que agora publicamos vêm demonstrar a necessidade imprescindivel e inadiavel da cooperação, no estudo das nossas endemias, entre os tecnicos de laboratorio e os clinicos do interior do país, os quais, quando solicitados, têm se mostra-

do sempre colaboradores inestimaveis, sempre prontos a dedicar seus poucos minutos de folga a trabalhos de pesquisa.

Em cerca de 2 anos — de Dezembro de 1939 a Dezembro de 1941 — registrámos no Estado de Minas Gerais 25 casos agudos da molestia de Chagas. Desses, 20 ocorreram no municipio de Bambuí, 3 no municipio de Luz, limitante com Bambuí,1 em Rio Paranaíba, na mesma zona Oeste do Estado e 1 em Grão Mogol, na zona Norte.

Verifica-se, portanto, que 80% dos casos agora publicados provieram de Bambuí e, si juntarmos a esses os 3 casos observados em Luz, nota-se que uma pequena zona do Estado contribuiu com 92% da nossa casuistica atual.

Dois fatores concorreram para isso. O primeiro é o fato de possuir a cidade de Bambuí um bem montado hospital, para onde afluem os doentes, principalmente os de parcos recursos, da região e onde os exames são feitos com grande cuidado, possibilitando assim grande precisão nos diagnosticos.

O segundo fator, evidentemente decisivo, é a indiscutivel abundancia da molestia de Chagas nessa zona.

E' preciso salientar que todos os doentes, com exceção apenas dos dois primeiros casos já publicados, foram espontaneamente à consulta, não tendo havido da nossa parte procura de enfermos, o que teria, sem a menor duvida, aumentado de muito o numero de casos registrados.

De acordo com os dados que possuimos atualmente, julgamos que é na zona sudoeste do Estado, compreendida entre os municipios de Luz, Ibiá e Araxá e a fronteira de São Paulo, que a molestia de Chagas atinge a sua maior incidencia. Os triatomideos domiciliares são aí extremamente abundantes e apresentam-se em alta percentagem infetados pelo *Schizotrypanum Cruzi*. Os casos clinicos da molestia, na sua forma cronica, são encontrados com grande facilidade.

Parece-nos que a molestia de Chagas é mais frequente nessa zona que, por exemplo, na de Lassance, ou pelo menos que alí a fórma aguda é mais grave e, por isso, mais frequentemente diagnosticada. Aliás, na localidade de Alagoas de D.

Inacia, municipio de Jaboticatubas, às margens do Rio das Velhas, como Lassance, em dois anos de trabalho continuo, não pudemos observar um só caso agudo da molestia, embora mais de 20% da população albergasse o *Schizotrypanun Cruzi*, conforme inquerito epidemiologico por nós realizado e que será oportunamente publicado.

Esses fatos mostram que a molestia assume diferentes aspetos nas diversas regiões onde existe, levantando-se assim novos e interessantes problemas, que precisam ser resolvidos o mais rapidamente possivel.

Tudo isso vem acentuar a genialidade do descobridor da moléstia, que, em condições particularmente difíceis, conseguiu individualizá-la perfeitamente, assinalando, como faz notar Mazza, todos os sintomas com absoluta precisão, embora nem sempre atribuisse a determinados sinais a importancia que mais tarde se verificou possuirem.

Assim, Chagas viu e registrou o edema palpebral unilateral, sinal esse a que foi posteriormente ligado, com toda a justiça, o nome do pesquizador que mostrou o seu enorme valor diagnóstico, como tambem viu e registrou os chagomas e as esquizotripanides, cuja grande importancia ressalta dos admiraveis trabalhos de Mazza e seus colaboradores.

Em resumo, pouco deixou Chagas para que os seus continuadores fizessem, a não ser a integral confirmação da sua obra, nas suas partes basicas e essenciais.

Dos 25 casos incluidos no presente trabalho, 15 apresentaram como sintoma inicial da molestia o edema palpebral unilateral ou sinal de Romaña (obs. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23 e 24). Em tres desses casos, porém, (obs. 1, 14 e 18) se notava na palpebra inferior esquerda (obs. 1), na palpebra inferior direita (obs. 14) ou no angulo palpebral interno do lado direito (obs. 18) uma mancha avermelhada, que precedeu o aparecimento do edema palpebral e que foi interpretada como sendo sinal de picada do inseto. Tratava-se, portanto, de chagomas palpebrais de inoculação.

Em tres outros casos (obs. 7, 8 e 13) observou-se tambem

o edema bi-palpebral unilateral com adenopatia satélite, sendo, porém, o aparecimento desse sinal precedido dos fenomenos gerais. Com as ressalvas impostas pela possibilidade de serem esses fenomenos gerais manifestações de outras molestias, que não a tripanosomose americana, podemos nesses casos considerar o complexo oftalmo-ganglionar como uma manifestação secundaria da molestia, talvez como chagoma hematogeno de localisação palpebral.

Julgamos, por isso, aconselhavel esclarecer-se definitivamente si deve ser chamado "sinal de Romaña" todo edema palpebral unilateral de origem chagasica ou sómente o edema palpebral que, por não ser precedido por qualquer outro sintoma (sinal de picaca de inseto, fenomenos gerais), indicaria possivelmente a entrada do *Schizotrypanum Cruzi* através da conjuntiva sã, segundo o ponto de vista inicial de Romaña.

Isso, evidentemente, em nada diminue o valor do sintoma, pois é pela presença do "olho inchado" que é diagnosticada atualmente a grande maioria dos casos agudos da molestia de Chagas. Dos nossos 25 casos, por exemplo, em 18, ou 72,% foi a sua existencia que levantou a suspeita da molestia, suspeita essa confirmada posteriormente por provas de laboratorio.

Um dos casos (obs. n.º 21) foi diagnosticado pela presença de um chagoma de inoculação na face anterior do antebraço esquerdo.

O exame histopatologico da lesão, feito pelo prof. Otavio de Magalhães, mostrou o aspeto caracteristico descrito por Mazza, tendo sido ainda encontradas leishmanias. O doente apresentava, tambem, tripanosomas no sangue circulante.

Posteriormente observámos outros casos tambem diagnosticados pela presença de chagomas de inoculação, os quais serão oportunamente publicados. Ressalta, assim, o valor desse sintoma, cuja grande importancia foi mostrada por Mazza e seus colaboradores.

O outro sintoma cuja relevancia foi assinalada pela escola chefiada por Mazza, é constituido pelos esquizotripanides, que já registrámos tambem algumas vezes, com aspéto mor-

biliforme (obs. 7 e 23) ou urticariforme (obs. 17). Recentemente (Março de 1942), a doente da obs. n.º 3, Maria Albina da Silva, que teve as manifestações agudas da molestia em Outubro de 1940 e já sofrera sarampo ha cerca de tres anos, apresentou-se com febre e erupção morbiliforme pelo corpo, tendo ficado aparentemente bôa com o uso de medicação anti-alergica. Embora não possamos afastar a hipotese de um acidente alheio à tripanosomiase, julgamos possivel tratar-se de uma esquizotripanide morbiliforme tardia.

Esta mesma doente (Maria Albina da Silva) apresentou, no decorrer do periodo agudo da doença, hipertrofia da tireoide, facilmente perceptivel pela inspecção e palpação. Essa hipertrofia regrediu paralelamente com os outros sintomas, conforme se pode verificar pelas fotografias 1 e 2.

Esse fato, já verificado pelos autores argentinos e uruguaios, principalmente Talice e colaboradores, vem mostrar que tambem a tireoide pode participar, como havia acentuado Carlos Chagas, do cortejo sintomatico da molestia, impondo uma revisão cuidadosa do assunto, afim de verificar-se exatamente qual a extensão e as consequencias desse acometimento.

Alguns casos (obs. 9, 10,11, 12, 17 e 25) apresentaram-se apenas com edema generalizado, geralmente mais acentuado no rosto, sem qualquer sintoma mais caracteristico. Esses casos, como de costume, foram primeiramente rotulados como impaludismo e sómente o fracasso absoluto da medicação especifica fez pensar em molestia de Chagas. Os exames de sangue, mostrando a ausencia de plasmodios e a presença de tripanosomas, provaram o acerto do ultimo diagnostico.

A confirmação do diagnostico clinico de molestia de Chagas foi feito pelo xenodiagnostico em 2 casos (obs. 1 e 2), pelo encontro de leishmanias no miocardio em um caso (obs. 6) e pelo encontro de tripanosomas no sangue circulante (exame a fresco, gota espessa ou esfregaço) nos demais vinte e dois casos.

Julgamos particularmente interessante a observação n.º 20, pelo fato de ter sido o diagnostico de suspeita feito pelo

dr. Ananias Ataliba Teixeira, clinico em São Gotardo, na zona Oeste do Estado, e confirmado pelo encontro do *Schizotrypanum Cruzi* em esfregaço do sangue da doente, pelo farmaceutico Bento Ferreira dos Santos, tambem residente em São Gotardo. Mostra esse caso que, como já afirmámos, o diagnostico da molestia de Chagas, no seu periodo agudo pelo menos, pode ser feito perfeitamente pelos clinicos e pequenos laboratorios do interior, sem ser preciso, na maioria dos casos, recorrer aos grandes laboratorios das capitais.

Basta para isso, repetimos, esclarecer a respeito aqueles clinicos que estão em contacto direto com as populações rurais. E' essa obra de propaganda junto aos clinicos do interior que é necessario fazer-se no Brasil. E acreditamos que, para ser inteiramente eficiente, deve essa propaganda ser feita em viagens frequentes pelo interior do país, devendo cada clinico ser visitado pessoalmente, fazendo-se-lhe as demonstrações necessarias, por meio de preparações microscopicas, figuras, projeção de dispositivos, etc.. E esse, como já acentuámos, um dos pontos fundamentais do programa de trabalho em vias de realização, no Estado de Minas Gerais.

Apresentamos aqui os nossos melhores agradecimentos aos Profs. Otavio de Magalhães e Borges da Costa e ao Dr. Cecilio Romaña, pelo valioso auxílio que nos prestaram na execução deste trabalho.

OBSERVAÇÕES

OBSERVAÇÃO N.º 1

(*Drs. A. Viana Martins e A. A. Tupinambá*)

T. L. T., sexo masculino, 46 anos, agrimensor, casado tio de um de nós (A. A. T.).

Reside em Montes Claros, em casa confortavel, onde não existem "barbeiros", mas, no exercicio da sua profissão, já tem morado em casas com esses insetos. Em Dezembro de 1939, em serviço de divisão de terras, no municipio de Grão Mogol, pernoitou varias vezes em casa de "pau a pique", onde eram os "barbeiros" extremamente abundantes, sendo por eles sugado frequentemente.

Certa manhã notou na palpebra inferior esquerda pequena papula pruriginosa, que atribuiu à picada de algum inseto. Cerca de 4 a 5 dias depois, começou a notar em ambas as palpebras desse lado um edema, que aumentou progressivamente até chegar a impedir completamente a visão. O edema era duro e de coloração arroxeada, não havendo secreção conjuntival. Ao mesmo tempo apareceu febre, com calafrios e insonia, obrigando o paciente a regressar a Montes Claros. Nessa cidade procurou um oculista, que nada encontrou que justificasse a sintomatologia, prescrevendo injeções de Protinjetol, vacinas anti-infecciosas, etc., terapêutica essa que não teve aparentemente influencia sobre a evolução da molestia, que começou a

regredir no fim de cerca de 30 dias, até desaparecimento completo.

Ao termos conhecimento desse caso, muitos dias após o inicio da molestia, escrevemos ao Dr. Leví Lafetá, Chefe do Centro de Saude de Montes Claros, pedindo-lhe que nos enviasse a historia clinica do doente, uma fotografia do mesmo e gotas espessas de sangue, remetendo-lhe ao mesmo tempo 5 larvas limpas de *P. megistus* para xenodiagnostico. Quando, porém, aquele ilustre colega entrou em contacto com o paciente, já havia desaparecido o edema, bem como a febre, de modo que foi julgada inutil a fotografia. Tambem as gotas espessas recebidas não se mostraram satisfatorias. Quanto aos "barbeiros" com que foi feito o xenodiagnostico, foram confiados a um laboratorista local, que posteriormente nos comunicou ter sido o mesmo positivo, sem precisar a data do exame, nem o numero de "barbeiros" que se infetaram.

Não satisfeitos com essa informação, aproveitámos uma viagem feita por um de nós a Montes Claros, para repetir o xenodiagnostico, que foi realizado em 2-8-1940, isto é, cerca de 9 mêses após o inicio da molestia, utilizando-se 5 larvas limpas de *P. megistus*. Examinadas essas larvas em 11-9-40, uma delas foi encontrada infetada. Parece-nos, portanto, tratar-se de um caso tipico de molestia de Chagas na sua fase aguda, com a porta de entrada cutanea palpebral, sem conjuntivite e acompanhada de sintomatologia caracteristica: edema palpebral unilateral, febre, etc..

OBSERVAÇÃO N.º 2

(Drs. A. Viana Martins e A. A. Tupinambá)

C. C. S., sexo masculino, com 16 anos, lavrador, solteiro, residente na fazenda das Tabocas, distrito de Córrego d'Anta, municipio de Luz, zona Oeste de Minas Gerais.

No dia 27-7-1940 fomos informados pelo sr. João José Rosa, proprietario da Fazenda das Tabocas, que um dos filhos de um agregado da fazenda apresentava, desde varios dias, acen-

tuado edema palpebral unilateral, sintoma esse, segundo o nosso informante, bastante frequente na sua zona. Já tendo observado nessa fazenda dois casos da forma cardiaca da molestia de Chagas (um filho e um sobrinho do proprietario), suspeitámos imediatamente tratar-se de um caso agudo de tripanosomiase americana, decidindo visitar o local, o que infelizmente só foi possivel varios dias mais tarde, em 9-8-1940.

Nessa ocasião o doente já quasi não apresentava edema, notando-se apenas ligeiro estreitamento da fenda palpebral esquerda. O ganglio preauricular esquerdo apresentava-se, porém, grandemente hipertrofiado, duro e movel. Temperatura axilar, 37°. Figado e baço um pouco aumentados e dolorosos. Informou o doente que "o olho esteve inchado cerca de um mês, coçando bastante". O edema variava um tanto de intensidade, chegando ás vezes quasi a impedir a visão. Havia secreção amarelada pouco abundante. Como não foi tomada a temperatura, não poude dizer com precisão si teve febre, porém relata que sentia o corpo quente, principalmente à noite, sêde anormal e sensação de abatimento fisico.

A pesquisa de *Schizotrypanum Cruzi*, em 10 gotas espessas de sangue do doente resultou negativa. Foi feito xenodiagnostico, utilisando-se 6 larvas de *Panstrongylus megistus*, das quais 4 se infetaram (exame feito em 25-9-1940, isto é, 47 dias após a sucção).

Ao mesmo tempo foi feito xenodiagnostico nas demais pessoas da familia e em um cão da casa, tendo sido negativo em cinco pessoas e no cão e positivo no menino V. C. S., com 10 anos de idade (1 larva de *P. megistus* em 4 utilizadas). Na residencia do doente (rancho de barro coberto de sapé) foram apanhados 35 exemplares de *P. megistus* (1 macho, 4 ninfas e 30 larvas), dos quais 4 estavam infetados pelo S cruzi (1 ninfa e 3 larvas).

A alta percentagem de barbeiros que se infetaram no xenodiagnostico (66%), mostra que os tripanosomas ainda eram relativamente abundantes no sangue circulante, embora fossem negativas as gotas espessas, o que fala evidentemente em fa-

vor de uma infecção recente. Tratava-se, pois, de um caso agudo benigno da molestia de Chagas, bastante caracteristico, no qual foi a conjuntiva a provavel porta de entrada.

OBSERVAÇÃO N.º 3

(*Dr. Antonio Torres Sobrinho*)

9 - X 1940, Maria Albina da Silva, 11 anos, sexo feminino, morena, brasileira, residente em Lagôa dos Monjolos, a cerca de 2 quilometros da cidade de Bambuí.

Mora em casa de adobes, rebocada, porém mal conservada, coberta de capim, com numerosos barbeiros, muitos dos quais infetados pelo *Schizotrypanum cruzi*.

Antecedentes pessoais: Sarampo em 1939, verminose.

Doença atual: Começou ha cerca de um mês, com congestão conjuntival do olho esquerdo, acompanhada de secreção, edema das palpebras correspondentes e circunjacencias e certo arroxeamento da região. Cerca de 8 dias depois, apareceram os mesmos fenomenos, porém mais atenuados, no lado direito. Afinal sobrevieram dôr e certo aumento de volume do epigastrio, dôr no estomago e na região lombar. Acusou febre alta no inicio.

Estado atual: Pele levemente arroxeada em torno do olho esquerdo e um tanto palida, seca e ligeiramente aspera nas demais regiões do corpo. Edema das palpebras de ambos os lados, porém particularmente pronunciado no lado esquerdo, em que se nota estreitamento da fenda palpebral. Este edema estende-se às zonas vizinhas e é de consistencia elastica, não deixando sinal à compressão. A face apresenta-se bastante infiltrada. Hiperemia acentuada das conjuntivas palpebrais e pouco aparente das conjuntivas oculares do lado esquerdo. Dacrioadenite esquerda. Ganglio preauricular esquerdo aumentado, bem como os retro e sub-maxilares. Ganglios epitrocleanos e axilares aumentados de volume, bem palpaveis, lisos, moveis. Hipertrofia sensivel da tireoide.

Aparelho respiratorio: nada digno de nota. Pulso — 108; pressão arterial — Max 8½, Mn. 4½; nada mais que chame atenção para o lado do aparelho circulatorio.

Temperatura axilar — 37,4.

Abdomen volumoso e tenso. Dôr à palpação nos hipocondrios e epigastrio. Figado a 2 dedos abaixo do rebordo costal, na linha axilar média.

Edema elastico dos membros inferiores.

A doente esteve internada de 17 de Outubro a 16 de Novembro de 1940, por gentileza do Prof. Borges da Costa, no Instituto de Radium, em Belo Horizonte. Conservou-se geralmente apirética nesse periodo, havendo raras elevações de temperatura, a mais alta das quais foi no dia 2 de Novembro — 37,3.

A maior frequencia do pulso foi de 118, nos dias 1, 2, e 7 de novembro.

Alta a 16 de novembro, com regressão de todos os sintomas, menos a dacrioadenite que ainda persistia.

EXAMES COMPLEMENTARES EFETUADOS

9 - X - 1940 — Pesquiza de *S. cruzi* em gota espessa — *positiva*.

22 — X 940 — Hematias — 5.080.000; leucocitos — 5.800;

Hemoglobina — 65% (Sahli)

Wassermann-Kolmer — positivo + +

Exame de fezes — ovos de *Ascaris lumbricoides* e de *Necator americanus*.

Exame de urina — nada de anormal.

19 - X - 1940 — Leucocitos — 9.000 por mmc.

Barbeiros domiciliares:

1 ♂ e 2 ♀ de *T. infestans* — positivos.

1 ♂ de *P. megistus* — positivo.

1 ♂, 2 ninfas e 7 larvas de *T. infestans* — negativos.

Xenodiagnosticos em pessoas da familia da doente, residentes na mesma casa:

José A. S.	— 38 anos	— *positivo*
Idalina M. J.	— 36 "	— *positivo*
Jeronimo A. S.	— 16 "	— negativo
Maria A. S.	— 14 "	— *positivo*
José A. S. F.	— 11 "	— negativo
Antonio A. S.	— 9 "	— *positivo*
Lazara A. S.	— 3 "	— negativo
Jesus A. S.	— 17meses	— negativo

Xenodiagnostico em animais da casa:

Cadela "Revolta" — negativo.

Cadela "Defesa" — negativo.

Gata "Teteia" — negativo.

Exame ocular efetuado pelo Dr. Geraldo Queiroga, em 25 - X - 1940.

Visão — OD = 1; OE = 1.

AO — Reflexos pupilares presentes e normais.

AO — Fundo de olho normal.

OE — Edema das palpebras, mais pronunciado na palpebra superior, que está deformada em S, caracteristico das dacrioadenites. Não se percebe à palpação a porção palpebral da glandula. Hiperpigmentação localizada nas palpebras do OE. Ganglios preauriculares infartados à esquerda.

Terapeutica:

36 cc. de solução a 3% do preparado "Bayer 7.602" em 14 doses, entre 23 de Outubro e 20 de Novembro de 1940.

OBSERVAÇÃO N.º 4

(*Dr. Antonio Torres*)

16 - X - 1940 — José Balduino Rodrigues — 2 anos e 6 meses, sexo masculino, cor branca, brasileiro, residente na fazenda "Araras", municipio de Luz. Há "barbeiros" em sua casa.

Iniciou-se a doença há cerca de 30 dias, com inchação das palpebras do lado direito e coloração arroxeada da região. O edema acentuou-se gradativamente, até determinar oclusão quasi completa da fenda palpebral. Cerca de duas semanas depois, sobreveiu febre, prostração e inapetência. Ulteriormente — ha oito dias — o edema estendeu-se a todo o lado direito da face e atingiu tambem as palpebras esquerdas.

Exame atual: Edema bipalpebral direito, duro e arroxeado. Palpebras esquerdas um tanto infiltradas. Edema duro ao nivel dos membros inferiores. Ganglio retromastoideu infartado. Temperatura 37.°.

O doente esteve internado no Instituto de Radium, em Belo Horizonte, de 21 de Outubro a 17 de Novembro de 1940. Nesse periodo, a temperatura mais alta observada foi de 37°,8, na tarde de 4 de novembro; a maior frequência do pulso verificou-se nos dias 2, 5 e 6 de novembro, com 120 pulsações por minuto.

Alta em 17 de novembro de 1940, com regressão dos sintomas oculares e gerais.

EXAMES COMPLEMENTARES

16-10-40 Exame a fresco do sangue — presença de *Schizotrypanum cruzi*.

22-10-40 Pesquiza do *S. cruzi* em gota espessa — positiva.
Hematias — 4.860.000.
Leucocitos — 9.400
Hemoglobina — 55% (Sahli)
Valor globular = 0,57

23-10-40 Exame de urina — nada de anormal.
25-10-40 Exame de fezes — Ovos de *A. lumbricoides*.
29-10-40 Wassermann-Kolmer — positivo+
17-11-40 Leucocitos — 8.600.

Exame ocular efetuado em 25-10-40, pelo Dr. Geraldo Queiroga:

O. D. — Edema discreto das palpebras, permitindo ao paciente mantê-las abertas. Conjuntiva e cornea normais.

Barbeiros domiciliares examinados:

3 ♂ e 4 ♀ de *P. megistus* — positivos.

2 ♂ e 2 ♀ de *P. megistus* — negativos.

Tratamento:

17cc. de sol a 3% de "Bayer 7.602", por via intramuscular, entre 23 de Outubro e 13 de Novembro de 1940.

OBSERVAÇÃO N.º 5

(*Dr. Antonio Torres Sobrinho*)

18 - 10 - 1940 — José Barbosa, sexo masculino, 4 anos, moreno-escuro, residente no povoado "Campos", fazenda dos Quarteis, municipio de Bambuí, distante da cidade pouco mais de 1 quilômetro.

Mora em casa rebocada, porém mal conservada, coberta de telhas, com numerosos barbeiros, muitos dos quais infetádos pelo *S. Cruzi.*

Nada de importante quanto aos antecedentes pessoais.

A molestia atual, iniciada no dia 12 de Outubro, manifestou-se por febre, coloração arroxeada e edema das palpebras do olho direito e região adjacente, com secreção conjuntival pouco abundante. Esse edema local acentuou-se em seguida, estendendo-se ao resto do corpo, tendo atingido os pés ha cerca de quatro dias (14-X-1940).

Apresenta no momento do exame (18-X-1940) pele seca e edema elastico bem perceptível na raiz do nariz, regiões palpebral e periorbicular direitas, que se mostram vermelho-violaceas, e acentuando-se ainda nas pernas e pés, pouco perceptivel no resto do corpo. Do lado direito se nota a fenda palpebral consideravelmente reduzida; secreção conjuntival pouco abundante; cornea e conjuntiva ocular normais, mas conjuntiva palpebral bastante hiperemiada; dacrioadenite.

Ganglio preauricular direito do tamanho aproximado de um grão de milho, dois ou três ganglios submaxilares palpa-

veis, do mesmo lado, um dos quais do tamanho aproximado de uma amendoa. Do lado esquerdo, um ganglio submaxilar aumentado. Ganglio epitrocleano palpavel, pequeno, à direita. Nada digno de nota quanto aos ganglios inguinais e ao epitrocleano esquerdo.

Figado e baço não aumentados. Lingua bastante saburrosa.

Pulso 95 e temperatura 37°,5, pela manhã, e ás 17 horas temperatura 40°.

O exame clínico do coração nada revelou de anormal.

Alguns estertores sibilantes e úmidos no pulmão direito; coriza; tosse.

O doente esteve internado no Instituto do Radium, em Belo Horizonte, de 21-10 a 17-11-1940, periodo no qual foi de 38°,5 a temperatura mais alta observada, na tarde de 1.° de Novembro. A maior frequencia do pulso foi de 128, na tarde de 2 de Novembro. Alta em 17 de Novembro, com regressão dos sintomas oculares e gerais.

EXAMES COMPLEMENTARES

18-10-40 — Exame a fresco do sangue — positivo para *S. Cruzi*.

19-10-40 — Neutrs. — 33,5% ; eosin — 1,0; mastz. — 0,5; linf. — 59,5; monos. — 5,5%.

23-10-40 — Pesquisa de *S. Cruzi* em gota espessa — positiva.

Hemoglobina — 55% (Sahli); hématias — 4.400.000; leucocitos — 13.600.

27-11-40 — Leucocitos — 11.000.

22-10-40 — Exame de fezes — quistos *E. coli*, ovos de *A. lumbricoides* e *Tric. trichiurus*.

23-10-40 — Exame de urina — nada de anormal.

29-10-40 — Wassermann-Kolmer — Positivo +++

Exame ocular efetuado pelo Dr. G. Queiroga, em 25-10-1940:

O. D. — Grande edema difuso das palpebras, mais acen-

tuado na porção supero-ext. da órbita. Não se sente à palpação o endurecimento da porção palpebral da glandula lacrimal, quando inflamada.

Conjuntiva palpebral ligeiramente congesta.

Tratamento:

12 cc. de "7.602", via intra-muscular, do dia 28 de Outubro a 20 de Novembro de 1940.

Barbeiros domiciliares:

2 ♂ e 1 larva de P megtistus — positivos.

1 ♀ de *P. megistus* — negativa.

OBSERVAÇÃO N.° 6

(*Drs. Antônio Torres e Antônio Torres Sobrinho*)

22-10-1940 — Geralda Mota, sexo feminino, 4 anos, côr branca, residente na fazenda "Ingazeiro", município de Bambuí.

Admitida ao ambulatorio do Hospital N. S. do Brasil, em Bambuí, a 22-10-1940.

Nada de interesse quanto aos antecedentes familiares.

Antecedentes pessoais: sofreu sarampo e uma dermatose herpetiforme.

A doença atual começou ha 18 dias, por febre e edema palpebral esquerdo, com coloração roseo-violácea das pálpebras e adjacencias, secreção conjuntival muco-purulenta, do mesmo lado.

Ao exame clínico, efetuado em 22 de Outubro, apresenta ainda as manifestações oculares referidas e edema elastico generalizado, mais perceptivel nos pés. Ganglios pre-auricular, parotidiano e submaxilar esquerdos volumosos; inguinais e axilares tambem aumentados; epitrocleano direito pequeno.

Temperatura — 38°,7, à tarde. Pulso — 150.

Lingua ligeiramente saburrosa. Não há sinais bem perceptiveis de aumento do figado e baço, achando-se este último um pouco doloroso. Ventre distendido e timpanico. Ritm.

cardiaco acelerado, com bulhas ligeiramente abafadas. Nada de anormal ao exame do aparelho respiratorio.

Em 25 de Outubro foi levada ao Hospital N. S. do Brasil em franca dispnéa cardiaca, com extremidades frias e cianóticas, tendo falecido ao ser medicada. Retiraram-se o coração e fragmentos do figado e do baço, para exame histopatologico.

EXAMES COMPLEMENTARES

22-10-40 — Pesquisa do *S. Cruzi* em seis gotas espessas — Negativa.

Barbeiros domiciliares examinados:

2 ♂, 5 ♀, 3 ninfas e 3 larvas de *P. megistus* — positivos;
1 linfa e 2 larvas de *P. megistus* — negativos.

Exames histopatologicos efetuados pelo Prof. Otavio de Magalhães.

Laminas 3.718.

Fixação — Bouin. Inclusão em parafina. Coloração — hemalumen — eritrosina — açafrão.

Resultado:

Baço: — Polpa esplenica profusamente hemorragica. Ha mesmo pequenas rupturas nos seios, com fócos de pequenas hemorragias. Desaparecimento quasi completo dos elementos linfoides do orgão. Edéma. Ha numerosos polimorfonucleares.

Figado: Congestão de orgão. Hiperplasia das celulas de Kupéfer e do sistema reticulo-endotelial. Ha nos capilares polimorfonucleares, monocitos e linfocitos. Necrose irregular de celulas hepaticas em varias regiões dos lobulos. Não vimos quistos parasitarios.

Coração: Miocardite intersticial difusa e intensissima, formada de monolobados, numerosos polimorfonucleares e alguns plasmazellen. Si bem que o processo inflamatorio seja difuso, quasi em lençol, ha fócos mais densos, onde ora dominam os polimorfonucleares, ora os monolobados. Em todos esses fócos, a proliferação his-

tiocitaria é assinalada. Ha muitos quistos de parasitos (com aspeto de leishmanias) em todos os tamanhos, esparsos pelo parenquima, no centro ou não do processo reacionário. Ha pontos onde a fibra muscular cardiaca tem um aspeto que lembra o da degeneração hialina.

OBSERVAÇÃO N.º 7

(Dr. Antonio Torres Sobrinho)

25-10-1940 — Inês Rezende, sexo feminino, 4 anos, brasileira, branca, residente na Fazenda "São Vicente", municipio de Bambuí.

Nada de interesse quanto aos antecedentes familiares. Sofreu varicela, adenite e, mais recentemente, uma crise convulsiva.

A 25-10-1940, quando veiu à consulta, achava-se no sexto dia da doença, que se iniciou por febre e uma erupção semelhante à do sarampo, generalizada a todo o tegumento cutaneo. Logo depois se verificou uma adenite submentoniana, em seguida à qual se manifestou edema das palpebras direitas e da região adjacente, com coloração vermelho-violacea.

Ao exame objetivo, apresenta rubefação e edema das palpebras direitas e da zona adjacente e hiperemia da conjuntiva palpebral.

Exantema morbiliforme ao nivel das coxas. Temperatura — 40°. Lingua saburrosa. Ganglios epitrocleanos esquerdos aumentados de volume.

Como a doente procedia de zona palúdica, foi feita a medicação anti-malarica, enquanto se aguardava o resultado do exame de sangue. Esse tratamento não produziu modificação sobre a febre e o estado geral, que se mantiveram inalterados. O edema palpebral acentuou-se a ponto de não permitir a abertura do olho. Na zona sub-orbitária o edema se tornou mole, de sorte a deixar sinal persistente à compressão. Percebeu-se então o aparecimento de um ordeolo na palpebra superior di-

reita, pelo que se passou ao uso de topicos oculares adequados, sulfanilamida *per os* e em injeções, Sulfanilvacin, etc. O ordeolo evoluiu rapidamente para supuração franca. Após alguns curativos, nos quais saiu pús abundante, verificou-se diminuição do edema palpebral, melhora do estado geral e queda progressiva da temperatura, que veiu a normalizar-se 5 dias depois.

Voltou à consulta à tarde do dia 6 de Novembro, com 36°,5 de temperatura, 120 de pulso. Edema elástico da palpebra inferior direita e de parte da face do mesmo lado, a ponto de apagar quasi por completo os sulcos naso e labio-genianos. Ganglios pre-auricular, submaxilares, submentoniano, axilares e inguinais aumentados de volume; pequenos ganglios epitrocleanos palpaveis. Edema duro discreto dos pés e pernas. Figado e baço sem aumento perceptivel. Ausencia de sinais clínicos de importancia, ao exame dos demais orgãos.

A 25 de novembro, quando voltou ao exame o edema da palpebra e da face se havia desvanecido quasi inteiramente. Tanto os ganglios preauriculares de ambos os lados, como os das demais regiões em que são facilmente accessiveis à palpação, se achavam aumentados de volume.

Figado e baço de dimensões normais. Ligeiro edema elastico dos membros inferiores. Temperatura — 36°,7. Pulso — 119.

26-11-1940 — Temp. 36°,9. Pulso — 118
27-11-1940 — Temp. 37° Pulso — 94
7- 1-1941 — Apresenta ainda ligeira hipercromia da pele da região afetada, poliadenia pronunciada e figado aumentado de volume. Tempera. — 36,8.

EXAMES COMPLEMENTARES

25-10-40 — Pesquisa do hematozoario de Laveran em gota espessa — negativa.
Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

29-10-40 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

Barbeiros domiciliares examinados:

1 ♂ e 1 ♀ de *T. infestans* — positivos.

1 ♂ de *T. infestans* — negativo.

OBSERVAÇÃO N.º 8

(*Dr. Antonio Torres Sobrinho*)

4-11-1940 — Sebastião Claudio, 5 anos, branco, residente na fazenda "Sapé", municipio de Bambuí. Ha barbeiros em sua casa.

Admitido ao ambulatorio do Hospital N. S. do Brasil em 4-11-940. A doença iniciou-se cerca de 15 dias antes, com febre e dôres no ventre; 8 dias após o aparecimento destes sintomas, manifestou-se edema bipalpebral do lado direito, com adenite preauricular.

Foi levado a um farmaceutico, que lhe administrou medicação para malaria. Há três dias se iniciou o edema.

Exame em 4-11-1940 — Edema duro, elastico, bem pronunciado, das palpebras direitas e adjacencias, com coloração vermelho-violacea. Inicio dos mesmos sintomas do lado esquerdo. Hiperemia das conjuntivas palpebrais, mais acentuada à direita. Ganglio pre-auricular direito volumoso, perceptivel mesmo à inspecção, cervicais esquerdos e parotidianos direitos tambem aumentados. Edema duro e elastico dos pés e pernas. Figado discretamente aumentado e doloroso. Baço aumentado, palpavel. Temperatura — 37º. Pulso — 116.

EXAMES COMPLEMENTARES

4-11-1940 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

25-11-1940 — Hematias — 4.830.000.
Leucocitos — 8.200
Hemoglobina — 68% (Sahli)
Valor globular = 0,70

26-11-1940 — Xenodiagnostico: 6 larvas de *P. megistus*, examinadas em 9-1-1941 — todas infectadas. Wassermann —Kolmer — negativo.

OBSERVAÇÃO N.º 9

(*Dr. J. Elias Lasmar*)

3 - 12 - 1940 — Elvira Fernandes Coutinho, sexo feminino, branca, 22 meses, Peso — 8 Kg.,100 grs. Altura — 0m,77. Reside em "Capão Escuro", a 2 leguas da cidade de Bambuí. Casa de barro, madeira e capim, separada da habitação mais proxima por uma distancia de 500 metros. A uns 400 mts. está situada a mata, de recente formação.

A casa, construida há 3 anos, tem atualmente grande quantidade de "barbeiros"; o proprietário suspeita que os mesmos vêm do mato.

Doença atual: — Começou no dia 22 de Novembro, com febre e vomitos. No 4.º dia apareceu uma inchação generalizada, que chegou ao maximo no 8.º dia do inicio da doença. Nessa epoca o estado da criança era grave, apresentando ela abatimento, sonolencia, edema generalizado, pulso extraordinariamente frequente e temperatura de 39º,8. Nos dias subsequentes o estado geral melhorou, baixando a temperatura e desaparecendo progressivamente o edema.

Estado atual — Observada pela primeira vez em Bambuí, no dia 3-12-1940, apresentava sonolencia e grande abatimento, permanecendo indiferente, com os olhos entreabertos. A temperatura atingiu a 39º,8, havendo edema generalizado por todo o corpo, especialmente visivel ao nivel do rosto e nas palpebras. Esse edema era brando e palido, não conservando a impressão dos dedos. Abdomen consideravelmente distendido, impedindo a bôa palpação. Rêde venosa colateral adbomino-toracica bem evidente. Epigastrio doloroso à palpação. Figado consideravelmente aumentado de volume, ocupando todo o abdomen superior.

Por suspeita de tratar-se de um caso agudo da doença de

Chagas, foi feito exame de sangue em gota espessa, que confirmou o diagnostico.

Internada no Hospital Oswaldo Cruz, em Manguinhos, no dia 5 de dezembro.

A 6 de dezembro, apresentava-se desnutrida, agitada, nervosa, chorando continuamente. Estado geral um pouco melhor, com desaparecimento completo do edema, tanto no rosto, como no resto do corpo. Observou-se uma estomatite, que se pdia atribuir ao nascimento dos molares. Ganglios cervicais e axilares de pequeno tamanho, inguinais muito ingurgitados. Nada de particular ao exame do aparelho respiratorio. Ritmo cardiaco muito acelerado, bulhar debeis e distantes; não se percebe arritmia. Figado diminuido em relação ao exame anterior, mas ainda bem palpavel e doloroso. Baço tambem aumentado de volume, palpavel por baixo do rebordo costal. Rêde venosa colateral ainda visivel. Percebe-se, na região glútea, a formação de um abcesso, causado por infecção feita anteriormente.

A 8 de dezembro observou-se novamente o aparecimento de um edema generalizado, mais acentuado no rosto e nas palpebras; este edema se conservou aparente cerca de uma semana.

A partir do dia 8, a febre manteve-se ainda por mais de 20 dias, com predominancia vesperal. Temperaturas mais altas observadas: 39°,4 no dia 7 de dezembro, 39°,3 no dia 13 e 39°,5 no dia 21. De 26 de dezembro em diante, a febre se conservou abaixo de 38°, baixando gradativamente, até completo desaparecimento.

Alta no dia 1 - 1 - 1941.

EXAMES COMPLEMENTARES

3-12-40 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

Hematias — 3.910.000
Leucocitos — 4.920
Hemoglobina — 45% (Sahli)
Valor globular — 0,68

Formula leucocitaria

	3-1-40	6-1240	9-12-40	14-12-40
Mielocitos neutrofilos	2,0	0,0	0,0	0,0
Polimorfonucleares neutrofilos	51,0	30,5	38,0	44,5
Eosinofilos	0,0	5,0	7,0	3,5
Pro-linfocitos	3,0	0,0	0,0	0,0
Grandes linfocitos	30,0	24,5	15,0	8,5
Pequenos linfocitos	0,0	28,5	31,0	35,5
Linfocitos histioides	4,0	0,5	0,0	0,0
Monocitos	4,0	8,5	8,0	6,0
Celulas de Türck	4,0	1,5	0,0	1,5
Celulas de Rieder	3,0	1,0	1,0	0,5

11-12-1940 Exame de fezes — ovos de *A. lumbricoides*

Exame de urina:

Albumina — traços leves
Glicose — ausencia
Sedimento — celulas descamativas; grande quantidade de bacterias de fermentação.

13-12-1940 — Dosagem de cloretos na urina — 12,60 por mil.

Barbeiros domiciliares examinados

7 ♂ de *P. megistus* — positivos
2 ♂ e 3 ♀ de *P. megistus* — negativos

Tratamento: 23 cc. de sol. a 3% de "Bayer 7.602", entre os dias 12 e 20 de dezembro.

Formula leucocitaria com reação de oxidase

Polimorfonucleares	39,5%	47,0%
Linfocitos	54,0	46,0
Monocitos	6,5	7,0

11-12-1940 Biopsia do ganglio inguinal.

Gangliograma:

Hemocitoblastos	30 %
Linfoblastos	4,0
Prolinfocitos	42,0
Linfocitos	50,0
Celulas plasmaticas	1,0

O exame do gangliograma mostra uma *hiperplasia evolutiva tipo comum,* segundo a classificação de Pawlosky, sem desvio na morfologia das celulas, que apresentam um aspéto normal.

Exame histologico — (Prof. Magarinos Torres) Hiperplasia generalizada do tecido linfoide, sem grande aumento dos centros germinativos, com forte infiltração linfoide dos cordões e aparecimento de grande quantidade de celulas histioides no seio dos acumulos linfocíticos.

OBSERVAÇÃO N.º 10

(*Dr. Antônio Torres Sobrinho*)

14-12-1940 — Vicente Pedro Gomes, 6 anos de idade, moreno, brasileiro, residente no local denominado "Lagoa Rasa", municipio de Bambuí. Mora em "cafúa", onde foram encontrados "barbeiros".

Nada digno de nota nos antecedentes familiares. Sofreu coqueluche aos 3 anos e sarampo aos 4. Expele vermes.

Ha cerca de 20 dias se iniciou a molestia atual, com dôres abdominais e febre, sem edema ocular; a dôr abdominal tem continuado até hoje. Ha 8 dias surgiu edema palpebral que, segundo informa a mãe do paciente, se iniciou concomitantemente em ambos os olhos, estendendo-se logo a todo o corpo, particularmente aos membros inferiores. A febre tem ocorrido diariamente, via de regra com elevação vesperal.

Exame atual: Pele um tanto seca e palido-terrosa, sem aumento apreciavel de pigmentação na região peri-ocular. Conjuntivas palpebrais um tanto congestas, bulbares inalteradas.

Edema elastico das palpebras, rosto, tronco e membros inferiores, oferecendo o aspecto de edema mixedematoso.

Ganglios preauriculares, retro e submaxilares, cervicais, supraclaviculares, axilares, epitrocleanos e inguinais palpaveis, uns volumosos, outros muito pequenos, mas todos indolores, lisos e moveis.

Ventre volumoso, timpanico. Borda inferior do figado lisa à palpação e a um dedo transverso acima da transversal que passa pela cicatriz umbelical; borda superior para cima d· 5.º espaço intercostal; o orgão é doloroso à pressão. Em razão do volume do figado e da tensão abdominal, é dificil o exame do baço.

Temperatura às 8,50 hs. da manhã — 37,3; pulso 118 por minuto; respiração — 41 por minuto.

Aparelhos circulatorio, respiratorio, urinario e sistema nervoso sem alterações dignas de nota.

A 21-12-1940, depois de ter usado Sezonan por espaço de uma semana e Hemosplenina, achava-se com o ventre bem mais flacido, figado a cerca de 2 dedos abaixo da reborda costal, à expiração; temperatura 37º, estado geral melhor, edemas quasi desaparecidos.

EXAMES COMPLEMENTARES

12-12-1940 Pesquiza de *S. cruzi* no sangue a fresco — positiva.

Idem, em gota espessa — positiva.

Xenodiagnostico — positivo (examinados 2 "barbeiros" em 23-1-41, sendo 1 positivo e 1 negativo)

Barbeiros domiciliares examinados:

1 ♂ e 1 ♀ de *P. megistus* — positivos.
1 ♂ de *P. megistus* — negativo.
2 ♂ e 2 ♀ de *T. infestans* — negativos.
2 ♂ e 1 ninfa e 1 larva de *T. infestans* — negativos.
Não foi feita medicação.

OBSERVAÇÃO N.° 11

(*Dr. J. Elias Lasmar*)

26-12-1940 — Antonio Jeronimo de Carvalho, cor branca, 2 anos e 7 mêses, residente em "Posse", a 25 quilometros da cidade de Bambuí. Mora em casa de pau a pique (antigo paiol), onde são encontrados "barbeiros".

Nada de interessante nos antecedentes familiares e pessoais.

Apareceu no consultório com febre de 38°,5. Fígado bastante aumentado; baço, idem; edema generalizado, duro. Retirado o material para exame e emquanto se esperava pelo resultado, mandei aplicar *Paludam Infantil*, injeções de Esplena, comprimidos de Atepê. Depois de alguns dias, chegando aqui, afim de ir a Belo Horizonte, a criança se achava bem melhor, com pouco edema; estado geral, melhorado.

Adoeceu a 5 de dezembro, com febre alta, que se elevava à noite. Após 10 dias, apareceu edema duro, generalizado, que permaneceu por cerca de 10 dias.

O exame clinico, efetuado a 26 de dezembro, revelou um figado a 4 dedos do rebordo costal, baço palpavel, edema duro generalizado e ganglios preauriculares, axilares e inguinais muito infartados. Febre.

Transportado o doente para Belo Horizonte, o exame clinico aqui feito em 12 - jan. 1941 revelou já certa diminuição do volume do figado, que estava percutivel a 2 dedos abaixo do rebordo costal; ganglios preauricular direito, epitrocleano esquerdo, axilares e inguinais palpaveis; pulso — 134'.

EXAMES COMPLEMENTARES

26-12-40 — Pesquisa de *S. Cruzi* em gota espessa — positiva.

24- 2-41 — Xenodiagnostico — 4 larvar de *P. megistus*, examinados em 24-2-1941 — todas infetadas.

12- 1-41 — Exame hematologico: Hematias 4.700.000 por mm.; leucocitos — 11.800 por mm. Hemoglobina — 60% (Sahli)

13- 1-41 Xenodiagnostico — 5 larvas de *P. megistus*, examinadas em 24-2-41 — todas infetadas.

Não foi feito tratamento.

OBSERVAÇÃO N.º 12

(*Dr. Antonio Torres*)

8 - 1 - 1941 — Juvenal Pinto Alves da Silva, sexo masculino, 8 anos, branco, brasileiro, residente no local denominado "Pedrinhas", município de Bambuí.

O pai teve morte subita ha 8 anos. Mãe viva, portadora de bocio ha varios anos. Nada mais digno de menção quanto aos antecedentes familiares e pessoais.

A presente molestia iniciou-se ha cerca de um mês, com febre, tosse, calafrios, timpanismo abdominal, dôr no epigastrio, profundo abatimento, suores abundantes, artralgias. Em seguida surgiu edema da face e membros inferiores. A febre continuou até 5 dias atrás, tendo sido receitados Sezonan e Hemosplenina, por suspeita de malaria.

Ao exame, apresenta pele seca, palida, pequena turgescencia das palpebras, com coloração rosea esbatida das maçãs do rosto. Gânglio parotidiano direito palpavel com certa dificuldade, aumento dos ganglios cervicais e de um submaxilar do mesmo lado e tambem de alguns submaxilares esquerdos. Axilares de ambos os lados, epitrocleano direito e inguinais aumentados, ligeiramente duros, moveis e lisos. Temperatura — 37º; 114 pulsações por minuto.

Aparelhos circulatorio, respiratorio e urinario, bem como sistema nervoso, sem sinais que chamem a atenção, ao exame clinico.

Lingua ligeiramente saburrosa, ventre volumoso e timpanico. Figado bem aumentado de volume e doloroso à palpação. Baço palpavel à inspiração (ligeiramente aumentado).

A 14-12-1940, voltou o doente à consulta, já com diminuição do volume do figado e do baço. Voltou novamente alguns dias depois, com desaparecimento quasi completo dos sintomas apresentados.

EXAMES COMPLEMENTARES

3-12-41 — Pesquisa do *S. Cruzi* em gota espessa — positiva.

Tratamento: não foi feito.

Barbeiros domiciliares examinados:

5 ♂ e 1 larva de *P. megistus* — positivos.

5 ♂ 1 ♀ e 1 larva de *P. megistus* — negativos.

OBSERVAÇÃO N.º 13

(*Dr. Antonio Torres Sobrinho*)

10 - 1 - 1941 — Maria do Rosario Chaves, sexo feminino, 15 meses, branca, residente no bairro do Cruzeiro, cidade de Bambuí. Admitida ao ambulatorio do Hospital de N. S. do Brasil, em Bambúí, a 10 - 1 - 1941.

Nada digno de nota, quanto aos antecedentes familiares e pessoais.

A 17-12-1940, mais ou menos, adoeceu com febre, pouca tosse, ventre volumoso, vomitos, em que eliminou ascaris. Cerca de 10 dias após essa molestia febril, surgiu edema do olho direito, que se estendeu poucos dias depois ao resto do corpo.

Veiu ao Hospital, onde, por suspeita de doença de Chagas, foi feita pesquisa de *S. Cruzi* no sangue a fresco, com resultado negativo. Como a temperatura era baixa e satisfatorio o estado geral, ficou em observação, tendo-lhe sido administrado cloreto de calcio.

No dia 5-1-41 voltou com edema mais acentuado, temperatura de 37º,2 e um abcesso no couro cabeludo. Dilatado o abcesso e feita nova pesquisa a fresco de *S. cruzi*, com re-

sultado ainda negativo, recebeu a doente medicação para nefrite.

Voltou à consulta hoje (10-1-1941), com 38° de temperatura e 120 de pulso. Edema palpebral e periocular direito mais pronunciado, coloração róseo-violácea da região malar do mesmo lado. Edema do tronco e membros tambem mais acentuado. Gânglios pre-auricular direito, cervicais, epitrocleanos, axilares e inguinais aumentados. Pequeno aumento do figado e do baço. Os demais aparelhos e sistemas sem alteração de importância.

A 23-1-1941 foi transportada para Belo Horizonte, onde chegou febril e com estertores de bronquite, apresentando tambem um exantema, que evoluiu com aspéto nitidamente variceliforme e regrediu alguns dias depois.

EXAMES COMPLEMENTARES

27-12-40 — Pesquisa de *S. cruzi* no sangue a fresco — negativa.

5- 1-41 — Pesquisa de *S. cruzi* no sangue a fresco — negativa.

10- 1-41 — Pesquisa de *S. cruzi* no sangue a fresco — positiva.

10- 1-41 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

24- 1-41 — Hematias — 4.560.000.
Leucocitos — 34.200.
Hemoglobina — 55% (Sahli).
Valor globular — 0,61.
Xenodiagnostico — 4 larvas de *P. megistus*, examinadas em 13-3-1941 — todas infetadas.

OBSERVAÇÃO N.° 14

(Drs. Antonio Torres e Antonio Torres Sobrinho)

Jorge Miguel Elias, moreno, solteiro, 24 anos, lavrador,

residente na fazenda Campo Alegre, próximo a Medeiros, município de Bambuí.

Teve moléstias da infancia (sarampo, etc.), nada mais acusando digno de nota. Nega contágio venereo e impaludismo.

Nasceu em Campo Belo, de onde saiu, com 4 anos de idade, para a cidade de Bambuí, onde permaneceu cerca de dois anos, tendo-se transferido posteriormente para o sitio onde atualmente reside.

Mora em casa rebocada e caiada, na qual têm sido encontrados "barbeiros".

Em 7 de Janeiro de 1941 notou a presença de uma mancha avermelhada circular, de cerca de 1,5 centimetros de diametro na palpebra inferior direita. No dia seguinte sobreveiu edema da região, que se estendeu, alguns dias depois, à palpebra superior correspondente.

Esse edema, que chegou a determinar oclusão da fenda palpebral, acompanhou-se de prurido moderado e lacrimejamento. Cerca de uma semana após o aparecimento do edema, apresentou-se infartamento do gânglio pre-auricular direito. O doente acusou arrepios e febre moderada logo desde os primeiros dias, sendo que até os primeiros dias de Janeiro notou que também a pálpebra superior esquerda se achava edemaciada.

Exame em 7-2-41: Apresenta edema pouco acentuado das palpebras direitas e da superior esquerda, que se apresentam um pouco avermelhadas. Gânglio preauricular direito ainda bastante crescido.

Ausencia de edemas em outros pontos.

Pulso — 77, ritmado. Temperatura — 36°,4, à tarde.

Figado a 1 dedo abaixo do rebordo costal. Baço não palpavel.

Nada digno de nota ao exame dos demais aparelhos.

EXAMES COMPLEMENTARES

5- 2-1941 Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

Hematias — 7.140.000; leucócitos — 6.600; hemoglobina — 78% (Sahli); valor globul. — 0,55.

Xenodiagnóstico — 3 larvas de *P. megistus*. Examinadas em 1-5-41, todas se mostraram infetádas.

7- 2-1941 Wassermann-Kolmer — negativo

7- 9-1941 Wassermann-Kolmer — negativo
Reação de Machado — positiva (++++) (antígeno alcóolico de Romaña).

Barbeiros domiciliares examinados:
1 ♀ de *P. megistus* — positiva.

OBSERVAÇÃO N.º 15

(*Dr. Antonio Torres Sobrinho*)

— 28-3-1941 — Almerinda Teixeira Nunes, residente na fazenda do Cravo, distrito de Bambuí, 16 mezes de idade, branca. Mora em casa onde têm sido encontrados "barbeiros".

Antecedentes familiares e pessoais sem importância.

Há cerca de 20 dias lhe surgiu um edema e ligeira rubefação das pálpebras esquerdas e zona vizinha, seguido de febre, que se manteve alta uns 6 dias. Desde então os fenomenos inflamatórios locais e a reação geral foram-se atenuando, até chegar ao estado em que veiu à consulta.

Exame em 9-4-1941: Edema elástico, em regressão, das pálpebras esquerdas e circunjacências; ligeira reação conjuntival sem secreção; côr vermelho-arroxeada da região. Gânglio preauricular correspondente bem aumentado de volume, como também, em geral, quasi todos os gânglios habitualmente accessiveis à palpação. Figado e baço aumentados de volume; temperatura 37º,9, à tarde.

Aparelhos circulatório, respiratório e digestivo, sem modificações que mereçam menção.

EXAMES COMPLEMENTARES

9- 1-41 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

OBSERVAÇÃO N.° 16

(*Drs. Antonio Torres e Antonio Torres Sobrinho*)

5-4-1941 — Zulmira Piedade da Silva, 5 anos e meio, residente na Fazenda da Glória (Lobeira ou Aguazinha). Mora em casa de tijolos, sem reboco, de soalho de madeira e coberta de telhas, com muitos "barbeiros".

Tem 3 irmãos. Uma irmã mais velha (Maria, com 10 anos, surda-muda) já teve edema palpebral unilateral, com febre, ha cerca de 4 anos.

Adoeceu em 24-3-1941, com edema acentuado das pálpebras esquerdas, duro e de coloração violacea, e hiperemia acentuada das conjuntivas. Esta hiperemia durou cerca de 3 a 4 dias.

Foi à consulta 8 dias após o inicio da moléstia, apresentando nessa ocasião, além do edema palpebral, febre e inapetência. A febre, a principio contínua, ultimamente se tem manifestado com maior intensidade à noite, segundo informa a familia da paciente.

Exame em 14-4-1941 — Sinais oculares ainda acentuados, notando-se tambem a ocorrência da dacrioadenite. Infiltração subcutânea generalizada, mais pronunciada na face, que se apresenta com aspéto "bouffi".

Gânglios submaxilares aumentados, principalmente à esquerda; preauricular esquerdo igualmente infartado; epitrocleanos grandes; microadenia inguinal. Figado a dois dedos abaixo da reborda costal, na linha hemi-clavicular. Baço não explorável, devido ao timpanismo abdominal. Anorexia. Constipação e meteorismo do ventre.

Aparelho circulatório: eretismo; pulso ritmado, a 130 por

minuto. Temperaturas tomadas à tarde, nos dias 11, 12 e 14 de abril: 37,8 — 38,2 e 37,2.

Dia 17 de abril — Edema dos membros inferiores; edema palpebral tambem do lado direito, embora muito menos acentuado que no esquerdo (após 2 injeções — 7 cc. — de "Bayer 7.602".) Prisão de ventre,inapetência. Sistema nervoso normal

EXAMES COMPLEMENTARES

1- 4-41 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — posiva.
12- 4-41 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.
12- 4-41 — Xenodiagnóstico — 6 larvas de *P. megistus*. Examinadas em 13-6-41, mostram-se todas infetádas.
16- 4-41 — Hematias — 4.070.000
Leucocitos — 4.800
Hemoglobina — 73% (Sahli)
Valor globular — 0,91

Barbeiros domiciliares examinados:
1 ♂, 1 ♀ e 6 larvas *P. megistus* — negativos.
3 ninfas de *T. infestans* — negativos.

OBSERVAÇÃO N.º 17

(*Dr. Elias Lasmar*)

14-4-1941 — Ana Maria de Jesus, sexo feminino, 3 anos e 8 meses, branca, residente na fazenda do Ingazeiro, distrito de Corrego d'Anta, Municipio de Luz.

Mora em cafúa coberta de sapé, com barbeiros em abundancia.

Nada de importância quanto aos antecedentes familiares e pessoais. Adoeceu no dia 14 de março, mais ou menos, com febre e dispnéa. A febre era mais elevada à noite. Apareceu em

seguida edema duro e elástico localizado em todo o rosto. Nessa ocasião, apresentou também urticária generalizada (esquizotripanide urticariforme), cuja duração e data exata de aparecimento não foi possivel determinar.

Suspeitando-se inicialmente de malaria, foi-lhe receitado Paludan, do qual chegou a tomar apenas uma injeção.

Feitas preparações de sangue (esfregaços e gotas espessas) em 3-4-41, foram encontrados vários exemplares de *Schiszotrypanum cruzi*.

Examinada m 14-4-41, em Belo Horizonte, nada se observava digno de nota, a não ser ligeiro aumento do fígado. Baço não palpavel. Edema do rosto já desaparecido quasi completamente. Ventre crescido, timpânico, não doloroso. Gânglios submaxilares e inguinais pequenos.

Temperatura 37°,2, à tarde. Pulso — 118.

Nada a assinalar ao exame dos demais aparelhos.

EXAMES COMPLEMENTARES

3- 4-41 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

12- 4-41 — Xenodiagnóstico — 5 larvas de *P. megistus*. Examinadas em 11-6-41, 4 larvas mostraram-se infetádas.

17- 4-41 — Hematias — 4.250.000.
Leucocitos — 8.800.
Hemoglobina — 68% (Sahli).
Valor globular — 0,80.

OBSERVAÇÃO N.° 18

(*Dr. Antonio Torres Sobrinho*)

22 - 4 - 1941 — Claudio Tancredo, 3 anos e 6 meses, residente à rua do Quartel, em Bambuí. Pai falecido ha 2 anos (morte subita).

Residiu, até a idade de 1 ano, em casa rebocada, em que

não havia barbeiros. Mudou-se depois para a habitação em que atualmente reside (casa não rebocada e coberta de capim), onde têm sido encontrados numerosos barbeiros.

Adoeceu ha cerca de 1 mês, tendo inicialmente aparecido um sinal de picada de inséto no ângulo palpebral interno do lado esquerdo; sobreveiu no dia seguinte edema bipalpebral do mesmo lado, com intensidade crescente, até determinar oclusão do olho, manifestando-se tambem secreção muco-purulenta e apresentando as palpebras uma coloração arroxeada. Estes sintomas oculares perduraram cerca de duas semanas, começando depois a regredir, de modo que atualmente se nota apenas ligeira infiltração da pálpebra inferior, que apresenta coloração normal.

Gânglio preauricular bastante aumentado do lado esquerdo e não perceptivel à direita. Gânglios epitrocleano, sub-maxilar, inguinais e axilares palpaveis.

Queixa-se de dôres abdominais e ao nivel dos membros. O rosto apresenta ainda certa tumefação, notando-se também discreta infiltração nos membros inferiores.

Aparelho respiratório: estertores de bronquite predominantes do lado direito. Aparelho circulatório: pulso ritmado, 113 por minuto; desdobramento da 2.ª bulha.

Ventre crescido, não doloroso à palpação. Fígado com a borda inferior a 3 dedos abaixo da reborda costal. Baço não palpavel e de limites normais à percussão.

Temperatura, às 5 horas da tarde — 38°.

EXAMES COMPLEMENTARES

10- 4-41 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.
Xenodiagnostico — 4 larvas de *P. megistus*. Examinadas em 22-5-41. Todas se mostraram infetádas.

25- 4-41 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

Hematias — 4.615.000; leucocitos — 9.900, hemoglobina — 62% (Sahli); valor globular — 0,67.

OBSERVAÇÃO N.º 19

(*Dr. Antonio Pires Sobrinho*)

22-4-1941 — Maria Aparecida de Jesus, 3 anos e 3 mêses, branca, residente em Pedrinha, próximo a Bambuí.

Antecedentes mórbidos sem importância. Nunca teve paludismo.

Nada digno de nota quanto aos antecedentes familiares.

Mora em cafúa coberta de capim e sem rebôco, onde tem sido verificada a presença de numerosos barbeiros.

Adoeceu ha 15 dias, com febre e inchação no olho direito. A febre sobrevem geralmente à noite. Posteriormente se manifestou infiltração subcutânea no rosto, que se apresenta um pouco tumefeito. Nestes últimos dias a infiltração apareceu com mais intensidade nos membros inferiores. Temperatura às 4 horas: 37,7. Pulso: 126.

Gânglios: inguinais e axilares, crescidos; preauriculares e epitrocleanos não perceptiveis.

Pulso ritmado, 126 por minuto. Reforço do 2.º tom pulmonar. Fígado a 3 dedos abaixo do rebordo, na linha hemiclavicular. Baço a 2 dedos do rebordo costal esquerdo.

EXAME OFTALMOLOGICO

Olho direito — edema palpebral superior e inferior de média intensidade, mole e indolor ao táto; rima palpebral reduzida à metade; secreção. Não se nota local de picada. Conjuntiva bulbar de aspecto normal. Motilidade ocular normal, assim como reação à luz e à acomodação. Glandula lacrimal normal.

(Dr. B. Furtado Gomes)

EXAMES COMPLEMENTARES

22-4-41 — Pesquisa de *S. cruzi* em gota espessa — *positiva*.
26-4-41 — Hematias — 4.040.000
Leucocitos — 6.600
Barbeiros domiciliares:
2 ♂ de *P. megistus* — positivos
1 L de *P. megistus* — negativa

OBSERVAÇÃO N.° 20

(*Dr. Ananias A. Teixeira*)

1-11-1940 — "Ficha 1871 de 1-11-1940" (Rio Paranaiba Minas Gerais). Cananéa — 10 anos, branca, nascida e residente em Olhos d'Agua de São João, distrito de Araguá, municipio de Rio Paranaíba.

Ha cerca de uns 12 dias, lhe apareceu forte edema em ambas as palpebras do olho esquerdo. Não se queixou de dôr desde o inicio. Menina de desenvolvimento normal; mediolínea; pele ligeiramente resecada; estado geral bom.

Gânglio preauricular esquerdo do tamanho de um grão de milho; nada para o lado da boca, do nariz e do ouvido; conjuntivas oculares normais. Temperatura 38,5 e 138 pulsações por minuto. Ao exame geral, nada mais revela de interesse.

Evolução do caso: Lembrada a possibilidade de estar diante de um caso agúdo da Moléstia de Chagas, recomendei que a doente me fosse levada ao consultório, em S. Gotardo.

Só a 15 de dezembro conseguí ver de novo a doente. Estava com 37,5 e 126 pulsações. Edema e ganglio diminuidos. A doente recusou submeter-se à colheita de sangue. Foi fotografada. Pedí que me fossem enviados alguns "barbeiros" da casa, de cuja existencia havia me assegurado já na primeira consulta.

Em 30 de dezembro esteve no consultorio, com 38,0 de temperatura e 120 pulsações, tendo edemas e gânglio quasi desaparecido. Colheram-se esfregaços de sangue.

peratura e 126 pulsações, sem edema e sem reação ganglionar. Xenodiagnostico.

EXAMES COMPLEMENTARES

30-12-1940 Pesquisa do *S. cruzi* em esfregaços de sangue — *positiva* (Dr. Bento Ferreira dos Santos).
11-12-1941 Xenodiagnostico — 5 larvas de *P. megistus* — Examinadas em 27-3-41 — 4 larvas infetádas.

Barbeiros domiciliares:
1 N de P. megistus — *Positiva*
Xenodiagnostico em pessoas da familia:
João — 35 anos — negativo
Alderico — 12 anos — *positivo*.

OBSERVAÇÃO N.º 21

(Dr. Antonio Torres)

1-9-1941 — João Batista Caetano, brasileiro, de 15 anos, pardo, solteiro, lavrador, residente em Medeiros, municipio de Bambuí.

Nada digno de nota quanto aos antecedentes familiares. Teve sarampo aos dois anos.

Reside em casa cujas paredes são revestidas de rebôco e caiadas; piso de terra batida e cobertura de telhas. Ha barbeiros em sua residencia.

Doença iniciada ha cerca de 30 dias, ocasião em que notou uma elevação avermelhada e um pouco pruriginosa ao nivel do terço médio da face anterior do antebraço esquerdo. Dois dias depois sobrevieram hipertemia, arrepios e dôr nos membros inferiores. A febre, que apresentava elevações noturnas, vem desaparecendo ultimamente. Ha cerca de uma semana, apareceu um edema duro dos membros inferiores, mais pronunciado dos joelhos para baixo, o qual ainda persiste.

Exame em 2-0-41 — Mucosas um tanto descoradas, gan-

glios epitrocleanos, axilares esquerdos, submaxilares direitos e inguinais palpaveis. Um dos ganglios axilares esquerdos apresenta-se doloroso e bastante crescido. Presença do tumor já assinalado na face anterior do antebraço esquerdo.

Pulso a 128; ligeiro abafamento da 1.ª bulha e hiperfonese do tom aórtico. Figado a 2 dedos abaixo da reborda costal, na linha hemiclavicular. Baço palpavel e percutivel a dois dedos do rebordo. Temperatura às 15 horas — 36,9.

Pressão Mx — 10,25 Mn — 5.

Nada digno de nota ao exame dos demais aparelhos.

Diagnostico: Chagoma de inoculação na face anterior do antebraço esquerdo,terço médio. Adenites na região axilar esquerda.

Em 3-9-41, foi feita exerese do chagoma, pelo Dr. Osvaldo Borges da Costa, no Instituto de Radium, onde estava internado o doente, por gentileza do Prof. Borges da Costa. No dia seguinte se praticou a retirada dos ganglios da axila esquerda.

EXAMES COMPLEMENTARÊS

29- 8-41 — Pesquisa do *Scrizotrypanum Cruzi* no sangue a fresco — positiva.

3- 9-41 — Hematias — 4.350.000
Leucocitos — 6.600

12- 9-41 — Ex. de urina — nada de anormal.

Exame histo-patologico efetuado pelo Prof. Otávio Magalhães:

O exame microscopico revelou uma verdadeira pandermite. Em alguns pontos, espessamento do epitelio malpighiano, que não se achava infiltrado. Espaços interpapilares ligeiramente infiltrados. Dominam nas preparações as formações nodulares giganto-histiocitarias, ora espaçadas, ora proximas umas das outras e de tamanho vário.

Vêem-se nesses nodulos celulas gigantes, epitelioides, proliferação histiocitaria intensa, alguns "Plasmazellen", linfocitos, monocitos e alguns polimorfonucleares. O tecido gorduroso

sub-cutaneo está invadido por faixas de infiltração ou, em alguns pontos, verdadeiro lençol de infiltração, acompanhado de numerosos fibroblastas com necrose e substituição do tecido gorduroso. Em alguns pontos, principalmente nestes de necrose, ha equivalencia dos elementos polimorfonucleares e monocitarios. Em outros pontos dos espaços sub-epidermicos ha infiltração perivascular nitida.

Alta melhorado no dia 16-9-1941.

OBSERVAÇÃO N.º 22

(*Dr. Elias Lasmar*)

19-10-1941 — Maria Aparecida Passos, branca, 7 anos, residente em "Perdição", a 10 quilômetros da cidade de Bambuí. Mora em casa coberta de telhas e sem rebôco, onde têm sido encontrados barbeiros.

Antecedentes mórbidos sem importância no caso.

A doença iniciou-se ha cerca de 20 dias, com edema bipalpebral esquerdo, acompanhado de secreção conjuntival; febre com elevações vesperais, anorexia, prostração e dôres nas pernas.

Estado atual — (22-10-1941) Edema ainda bastante acentuado das palpebras esquerdas, não se notando sinais de dacrioadenite nem dacrioscistite. Hiperemia conjuntival de ambos os lados, mais acusada à esquerda. Gânglios preauriculares bem palpáveis, notadamente à esquerda; infarto pronunciado dos sub-maxilares esquerdos; aumento dos axilares, inguinais e do epitrocleano direito. Face ligeiramente infiltrada. Edema duro bastante acentuado dos membros inferiores. Fígado a 2 dedos abaixo da reborda costal. A doente não permitiu a palpação do baço, que, aliás, não se mostra aumentado à percussão.

Pulso: 140. Temperatura — 37º,2 à tarde. Nada digno de nota ao exame dos demais órgãos.

EXAMES COMPLEMENTARES

10-10-41 — Pesquisa do *S. cruzi* no sangue a fresco — positiva.
Eletrocardiograma — nada de anormal
Barbeiros domiciliares examinados:
3 ♂, 3 ♀ e 1 larva de *P. megistus* — positivos.
2 larvas de *P. megistus* — negativos.

Tratamento: 58 cc. de sol. a 3% do preparado "Bayer 7.602" (Ac.) entre os dias 22-10 e 13-11-1941.

OBSERVAÇÃO N.° 23

(*Dr. Antonio Torres Sobrinho*)

Sebastião Alves da Silva, 2 anos e 21 dias, moreno claro, residente na Fazenda de Olhos d'Agua, Municipio de Bambuí. Mora em cafúa em que ha barbeiros.

Antecedentes hereditarios e pessoais sem importância.

A doença atual iniciou-se ha cerca de um mês e 5 dias, com edema das palpebras, febre, erupção morbiliforme na face e nos membros, pronunciada diarrhéa. A erupção durou cerca de oito dias. Surgiram tambem, em seguida, edema generalisado, mais perceptivel nos pés, e ligeira tosse seca.

O exame revela a existencia de edema bipalpebral acentuado no olho esquerdo, discreto no direito, bem como edema pouco perceptivel no tronco e membros superiores, mais acusado nos membros inferiores. Trata-se de edema elastico, que não deixa *godet* à presão. Ganglios preauricular esquerdo e inguinais volumosos, cervicais e epitrocleanos palpaveis e pequenos. Figado e baço aumentados de volume. Os demais orgãos nada apresentam de importante ao exame clinico. Colorido normal da face. Temperatura às 11 horas — 37°,9. O pulso não foi registrado.

22-10-41 — Pesquisa de *S. cruzi* no sangue, a fresco — positiva.

OBSERVAÇÃO N.º 24

(*Dr. Antonio Torres Sobrinho*)

30-10-1941 — Osvaldo Ferreira, 9 anos, moreno-claro, residente na Fazenda da Gloria, local denominado Três Barras, Municipio de Bambuí. Mora em cafúa em que se encontram abundantes barbeiros.

Antecedentes hereditarios e pessoais sem importancia.

Ha cerca de 12 dias se iniciou a doença atual, com inflamação dos olhos (sic), seguida de febre, edema generalizalo, desanimo, sonolencia e inapetencia.

Ao exame apresenta edema elastico generalisado, particularmente acentuado nas palpebras esquerdas, discreto nas direitas, mais aparente nos membros inferiores. Ligeira rubefação palpebral e sub-palpebral esquerda. Gânglio preauricular esquerdo bem turgido, cervicais, submaxilares, epitrocleanos e inguinais aumentados de volume. Fígado e baço com as bordas anteriores palpaveis, três dedos abaixo das rebordas costais.

Temperatura às 11 horas — 37,6 — Pulso — 108.

Os demais orgãos e aparelhos, sem sinais clinicos que mereçam menção.

OBSERVAÇÃO N.º 25

(*Dr. Elias Lasmar*)

19-12-1941 — Jesus de Oliveira, 5 anos, côr preta, residente em "Mata do Minguta", municipio de Bambuí. Mora em casa de "pau a pique", sem reboco, onde ha barbeiros em grande quantidade.

Alguns dias anteriormente à doença da criança, foram encontrados barbeiros cheios de sangue em sua cama.

Antecedentes familiares sem importancia.

Doenças anteriores: sarampo e coqueluche.

A doença iniciou-se com febre alta, sobrevindo depois edema dos membros inferiores.

Exame em 19-12-1941 — Edema duro dos membros inferiores; fígado a cerca de 3 dedos transversos da reborda costal; baço ligeiramente aumentado; temperatura: 39,5.

EXAMES COMPLEMENTARES

19-12-41 — Pesquisa do *S. cruzi* em gota espessa — positiva.

FIG. 1 — Maria Albina da Silva — Obs. n.º 3 — Fot. em 9 de outubro de 1940 — Note-se o edema palpebral do lado esquerdo, o edema do rosto e a hipertrofia da tiroide

FIG. 2 — Maria Albina da Silva — Obs. n.º 3 — Fot. em 16 de novembro de 1940 — Note-se a fenda palpebral esquerda em forma de S., a diminuição acentuada da hipertrofia da tiroide e desaparecimento do edema do rosto

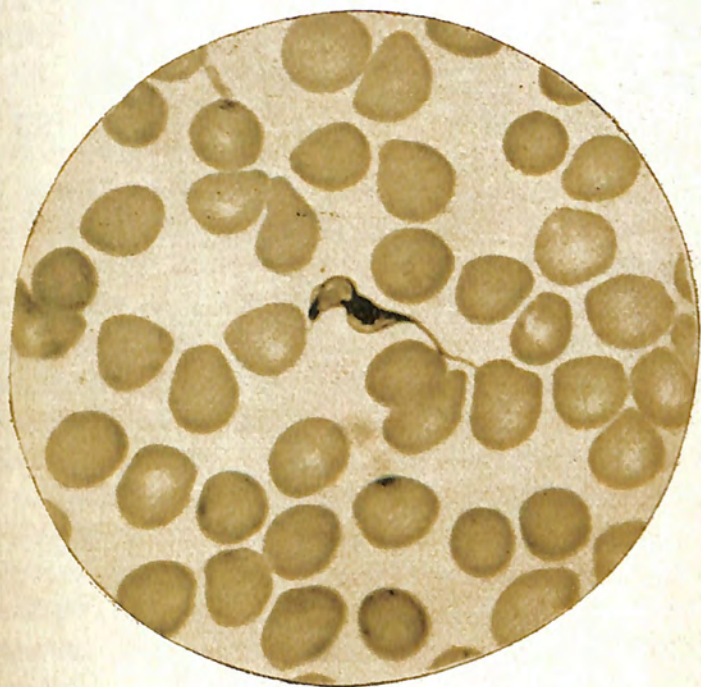



FIG. 3 — *Schizotrypanum Cruzi* — Esfregaço de sangue de Maria Albina da Silva — Obs. n.º 3 — 14 de outubro de 1940
Col. May-Grunwald-Giemsa

FIG. 4 — José Barbosa — Obs. n.º 5 — Fot. em 23-10-40
Sinal de Romana.

FIG. 5 — José Barbosa — Obs. n.º 5 — Fot. em: 23-10-40
Sinal de Romana.

FIG. 6 — José Barbosa — Obs. n.º 5 — Fot. em 16-11-40

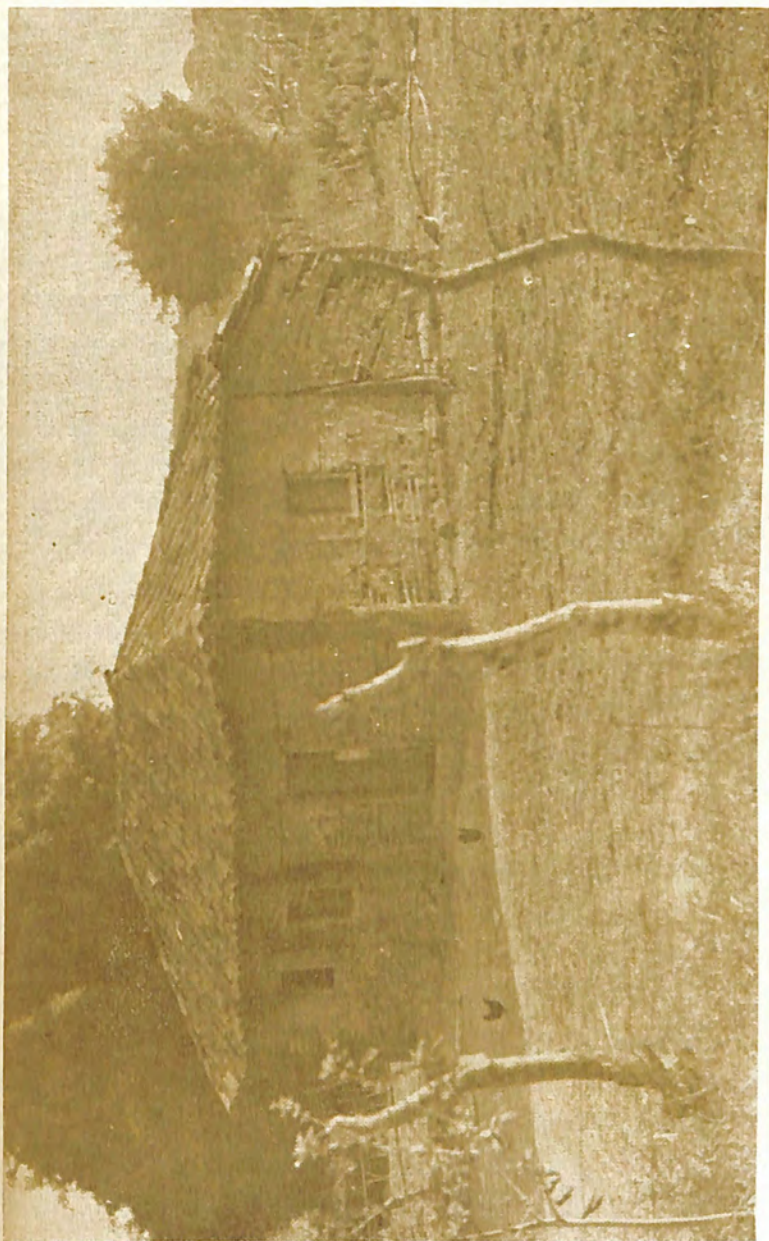



FIG. 7 — Casa onde reside José Barbosa — Obs. n.º 5 — Fazenda dos Quartéis — Bambuí

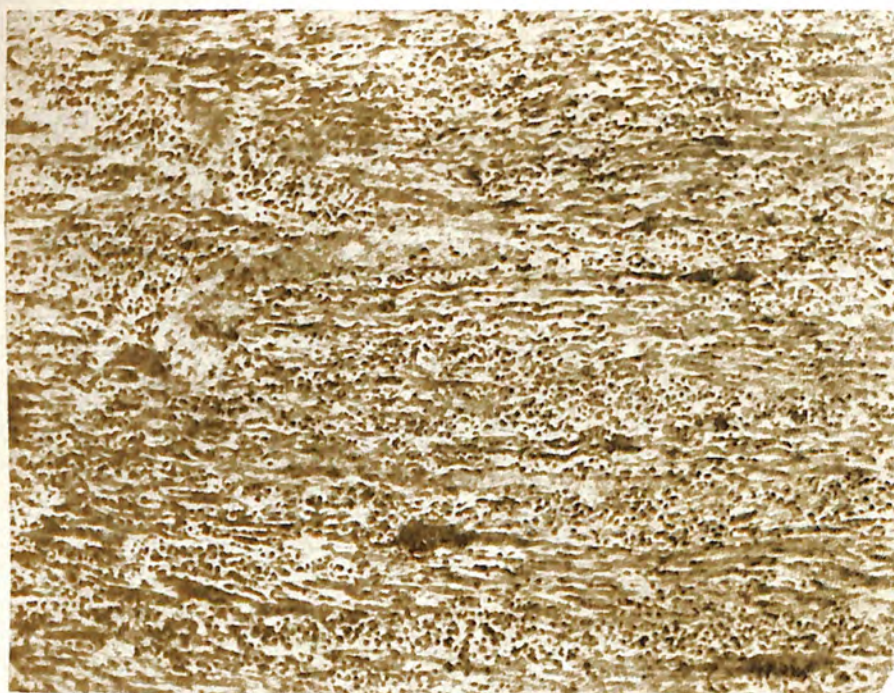



FIG. 8 — Corte de miocardio de Geralda Mota — Obs. n.º 6

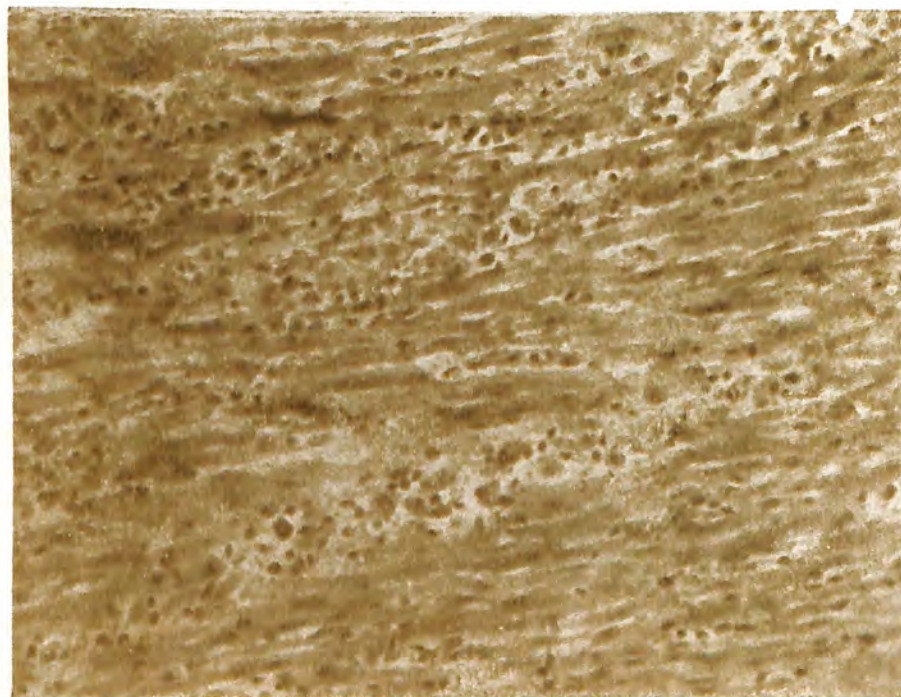



FIG. 9 — Corte de miocardio de Geralda Mota — Obs. n.º 6

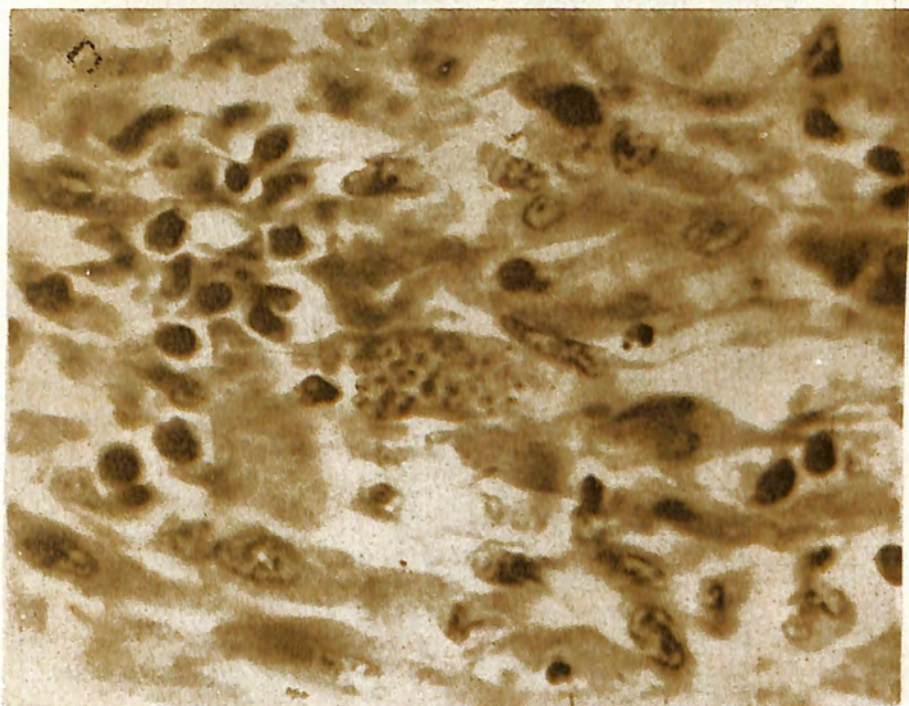



Fig. 10 — Côrte de miocardio de Geraldo Mota — Obs. n. 6. Formas *leishmania* do *Schizotrypanum cruzi*.

Fig. 11 — Vicente Pedro Gomes — Obs. n. 10, à direita e Juvenal P. Alves da Silva — Obs. n. 12, à esquerda. Fot. em 8-1-41.

Fig. 12 — Zulmira Piedade da Silva — Obs. n. 16. Fot. em 14-4-41. — Sinal de Romana.

Fig. 13 — Ana Maria de Jesus — Obs. n. 17. Fot. em 14-4-41.

Fig. 14 — Claudio Tancredo — Obs. n. 18. Fot. em 22-4-41. Sinal de Romana.

Fig. 15 — Maria Aparecida de Jesus — Obs. n. 19 — Fot. em 22-4-41.
Sinal de Romana.

Fig. 16 — João Batista Caetano — Obs. n. 21 — Chagoma do ante-braço esquerdo. — Fot. em 2-9-41.

Fig. 17 — João Batista Caetano — Obs. n. 21 — Chagoma do antebraço esquerdo. — Fot. em 2-9-41.

Fig. 18 — João Batista Caetano — Obs. .21 — Fot. em 2-9-41.

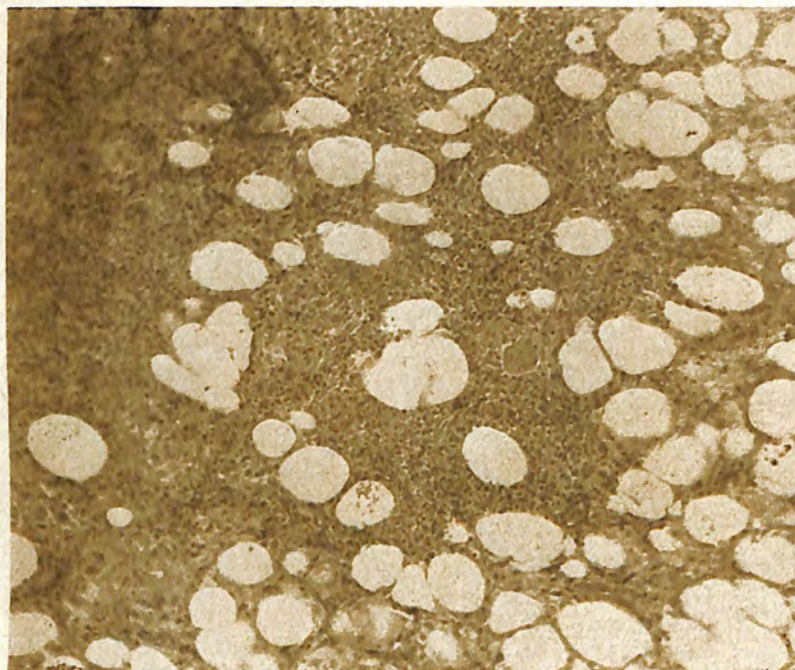



FIG. 19 — Chagoma de inoculação — aspéto microscopico.
João Batista Caetano — Obs. n.º 21

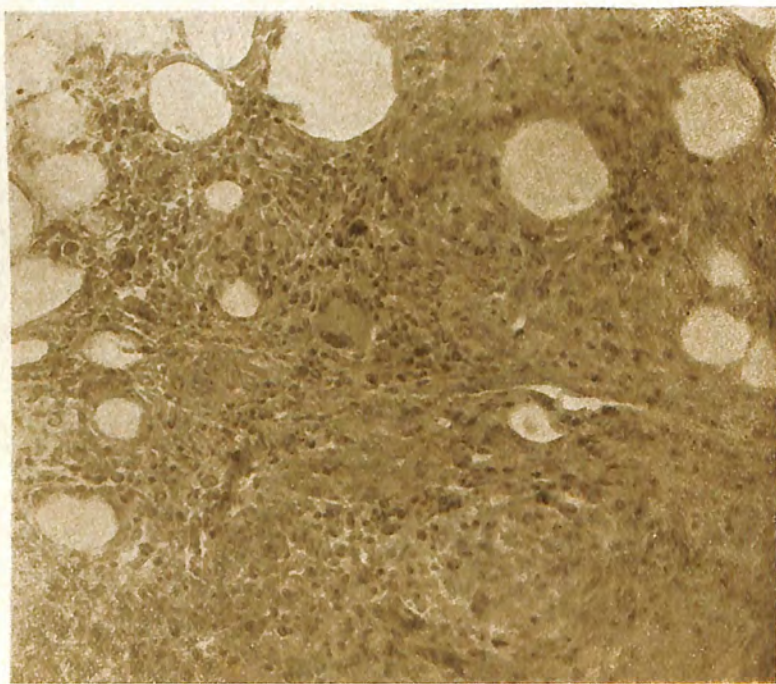



FIG. 20 — Chagoma de inoculação — aspéto microscopico
João Batista Caetano — Obs. n.º 21

Comentários

A Doença de Chagas Aguda sob o Olhar Pioneiro de Vianna Martins, Versiani e Tupinambá

Ana Maria Jansen
André Luiz Rodrigues Roque
Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos
Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)

Antes de discutirmos o artigo, é preciso entender as circunstâncias que o elevaram ao patamar dos 15 artigos históricos mais importantes para o estudo da doença de Chagas. É um trabalho do Instituto Ezequiel Dias e do Serviço de Estudo de Grandes Endemias do Instituto Oswaldo Cruz (Sege/IOC). O primeiro era dirigido por Otavio Magalhães e o segundo por Carlos Chagas Filho, em substituição ao seu irmão Evandro Chagas. Antônio Cardoso Fontes dirigia o IOC.

A publicação obedece ao estilo da época: após uma introdução com comentários, os autores descrevem caso por caso, minuciosa e detalhadamente, em um texto de agradável leitura. Ainda não havia agências de fomentos, Capes, Finep ou CNPq, os recursos eram poucos e as condições, precárias. A pesquisa no Brasil estava concentrada nos grandes centros São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte e ainda longe de estar inserida no cenário internacional. As revistas vinham de navio, demoravam a chegar, e o intercâmbio entre pesquisadores e instituições de pesquisa não era comum.

A revista, de abrangência local, contém ainda dois trabalhos de Otavio Magalhães, professor de fisiologia, respectivamente sobre pasteurelas de animais e escorpionismo, o que demonstra o amplo espectro das questões abordadas por um mesmo pesquisador na época. A especialização ainda não havia chegado. Vale mencionar que Amilcar Vianna Martins estudou também entre outros, xistossomose e flebotomíneos.

A IMPORTÂNCIA DO TRABALHO

São vários os aspectos importantes dessa publicação, entre as quais a validação de um sinal clínico bastante peculiar nos casos agudos da doença, o complexo oftalmoganglionar,

descrito pelo médico argentino e assistente de Salvador Mazza, Cecilio Romaña, em 1935, na IX Reunião da Mepra (Misión de Estudios de Patología Regional) em Mendoza, Argentina: o sinal de Romaña, assim denominado por Evandro Chagas em homenagem ao pesquisador, seu grande amigo. O sinal consiste em quadro ocular de porta de entrada da doença de Chagas aguda. Trata-se de um edema palpebral, unilateral, que envolve ingurgitamento ganglionar satélite (geralmente pré-auricular). Pode ocluir todo o olho e deixar, a longo prazo, um discreto fechamento da pálpebra afetada. Na verdade, o sinal fora visto (e fotografado) por Mazza e pelo próprio Carlos Chagas na Argentina e em Lassance, MG, sem receber a mesma atenção dada por Romaña. De fato, a descrição desse sinal por Vianna Martins e colabores como característico da forma aguda da doença representou um marco científico e epidemiológico, na medida em que facilitou enormemente o diagnóstico (Dias, 2006).

O conhecimento dos casos reportados pelo artigo, segundo o próprio Amilcar Vianna Martins em entrevista concedida a Ângelo Machado e Roberto B. de Carvalho, veio a partir de uma conversa corriqueira com um médico de Bambuí. Questionado por Martins "se não havia por lá indivíduos com um olho inchado", o médico, em um primeiro momento, respondeu que "não havia prestado atenção, mas que iria verificar". Poucos dias depois, esse mesmo médico encaminha uma menina com o olho inchado, a qual se verificou estar infectada. Era o primeiro caso agudo de doença de Chagas diagnosticado naquele município (Martins, 1990).

O estudo dos "25 casos agudos de Bambuí" (como ficou conhecida a publicação) representa a primeira descrição de um número expressivo de casos agudos no país desde o estudo conduzido por Carlos Chagas em Lassance. Para se ter uma idéia, durante sua trajetória, Chagas descreveu apenas 29 casos agudos e apenas outros quatro ou cinco haviam sido descritos até a publicação dos casos de Bambuí (Kropf, Azevedo & Ferreira, 2000). Chagas foi, durante muito tempo, tremendamente questionado, e a doença estava longe de ser reconhecida como problema de saúde pública importante. A descoberta e o estudo minucioso dos casos de Bambuí chamaram a atenção para a doença, mostrando que se tratava de um sério agravo, provavelmente não apenas localizado em Bambuí, mas em grande parte do território nacional. Era o reconhecimento da moléstia de Chagas como doença de elevada importância em saúde pública.

Outro aspecto relevante é a visão abrangente do problema: Vianna Martins, Versiani e Tupinambá destacaram a necessidade de se implementar um amplo e abrangente programa de pesquisa sobre a doença de Chagas em todo o país, que incluísse o levantamento dos casos crônicos e presença do vetor e capacitação de pessoal "na maior parte do território nacional". Como conseqüência dessa publicação, Henrique Aragão, que assumira a direção do IOC em 1943, decide instalar naquele município, em novembro do mesmo ano, o Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas (CEPMC), um posto do Instituto Oswaldo Cruz que será dirigido por Emmanuel Dias de 1943 a 1962. Segundo Kropf, Azevedo e Ferreira (2000), o trabalho desenvolvido em Bambuí foi responsável por garantir o reconhecimento da especificidade patológica e da relevância da doença como problema de saúde pública.

Os casos de Bambuí tiveram como principal característica a alta prevalência (72%) de alterações no complexo oftalmoganglionar, os edemas palpebrais unilaterais que normalmente envolviam ingurgitamento ganglionar satélite. A nomenclatura "sinal de Romaña" é evitada pelos autores no texto, pois na época ainda não havia consenso: não se havia estabelecido se todo edema palpebral unilateral de origem chagásica deveria receber essa denominação, ou apenas o que indicasse a entrada no parasito pela própria conjuntiva ocular, como supunha Romaña. O fato é que esses achados vieram, de uma vez por todas, consolidar essa alteração

como um instrumento diagnóstico importante quando a contaminação pelo parasito se processa no olho ou próximo a ele. Os autores também estavam atentos a outras localizações do chagoma de inoculação, como comprovam a exerese e o estudo e descrição de um chagoma de inoculação observado no antebraço de um jovem infectado. Tampouco escapou aos atentos observadores Vianna Martins, Versiani e Tupinambá o encontro de "um caso agudo benigno da doença": um menino de 10 anos cuja infecção foi comprovada por xenodiagnóstico, demonstrando assim que a infecção sem manifestações clínicas era possível.

O encontro de amastigotas em um corte de tireóide leva Vianna Martins e seus colaboradores a confirmar a tireoidite chagásica, manifestação descrita por Carlos Chagas e endossada por Miguel Couto. Mais tarde, essa manifestação seria reconhecida como um evento independente da presença do parasita, decorrente do caráter pan-infeccioso do *Trypanosoma cruzi*, capaz de colonizar praticamente qualquer tecido de seus múltiplos hospedeiros.

Outros aspectos importantes da epidemiologia da doença, muito pouco discutidos até então, aparecem de forma bastante enfática nesse trabalho. A destacar está o caráter regional da doença de Chagas, concluído com base na escassez de casos agudos em Lassance: "a moléstia (de Chagas) assume diferentes aspectos nas diversas regiões onde existe levantando-se assim novos e interessantes problemas". Os autores deixam claro que generalizações e medidas de controle baseadas em "cálculos teóricos sobre o número de cafuas (casas de pau-a-pique) existentes no Brasil e sobre a percentagem de seus habitantes que devem estar infectados" são insuficientes; era necessário adotar medidas abrangentes. Nada mais atual, como atestam os recentes surtos de doença de Chagas por ingestão de alimentos contaminados com formas infectantes do parasita. Adicionalmente, vale mencionar que o caráter regional da doença de Chagas representa, até hoje, um quebra-cabeça não resolvido.

Vianna Martins, Versiani e Tupinambá enfatizam ainda a necessidade da sensibilização e capacitação de médicos e laboratoristas, a serem conduzidas durante as expedições no campo, para o diagnóstico precoce da doença. Esse, aliás, era o principal objetivo almejado pelos autores quando da publicação do artigo. A criação do CEPMC três anos mais tarde era a confirmação de que esse grande objetivo havia sido alcançado.

Segundo Dias (1982), os estudos acerca da doença de Chagas em Bambuí, iniciados por Vianna Martins e colaboradores em 1940, podem ser divididos em três períodos: (i) o inicial (1940-1956), caracterizado por altos índices de triatomíneos com infecção natural pelo *T. cruzi*, presença maciça de *Triatoma infestans* e elevados índices de transmissão ao homem; (ii) o intermediário (1957-1970), que se inicia com os trabalhos de desinsetização para redução do *T. infestans* e da transmissão da doença ao homem, apresentando momentos de reinfestação domiciliar em algumas áreas rurais; (iii) um terceiro período, cujos marcos são os anos de 1971, pela consolidação da profilaxia antivetorial, e 1974, pela implantação da Vigilância Epidemiológica. Nesse período ocorrem o controle do *T. infestans* e a interrupção da transmissão da doença de Chagas ao homem, com o surgimento esporádico de adultos do *Panstrongylus megistus* nas casas rurais (Fernandes *et al.*, 2004).

Mais tarde, o próprio Vianna Martins seria vítima da doença de Chagas. Segundo seu relato (na entrevista supracitada), a infecção se deu em uma viagem à serra do Cipó, em Minas Gerais, onde dormira em uma pensão. Apesar de ter dormido em uma cama no centro do quarto, por achar que assim seria um 'alvo' menos provável, Vianna Martins acredita ter sido picado por um barbeiro atraído pela luz. Seis dias depois, sua febre teve início e capturas naquela pensão mostraram a presença de barbeiros contaminados. Durante mais de vinte anos Vianna Martins não sentiu absolutamente nada, até o aparecimento de uma dilatação do esôfago, que passou a incomodá-lo bastante. O cientista faleceu em 1990, aos 82 anos.

REFERÊNCIAS

DIAS, J. C. P. *Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil: estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982*, 1982. Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.

DIAS, J. C. P. A contribuição de Salvador Mazza, Cecilio Romaña e dos médicos argentinos ao estudo da doença de Chagas, 2006. Disponível em: Portal Fiocruz de Doença de Chagas, <www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=54>. Acesso em: 1 jun. 2009.

FERNANDES, A. J. *et al.* Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 10(4): 473-480, 1994.

KROPF, S. P.; AZEVEDO, N. & FERREIRA, L. O. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. *Ciências e Saúde Coletiva*, 5(2): 347-365, 2000.

MARTINS, A. V. Entrevista concedida a Ângelo Machado e Roberto B. de Carvalho, 1990. Canal Ciência. Disponível em: Portal Ibict, <ww.canalciencia.ibict.br/notaveis/txt.php?id=8>. Acesso em: 29 maio 2009.

De Volta ao Sertão Mineiro: 25 casos agudos em Bambuí e a renovação dos estudos sobre a doença de Chagas no Brasil

Simone Petraglia Kropf
Nara Azevedo
Programa de Pós-Graduação em História das Ciências e da Saúde
Casa de Oswaldo (COC/Fiocruz)

"Sobre 25 casos agudos de moléstia de Chagas observados em Minas Gerais", artigo de Amilcar Vianna Martins, Valdemar Versiani e Antonio Tupinambá, publicado nas *Memórias do Instituto Biológico Ezequiel Dias* nos volumes de 1939-1940, descreve um conjunto de casos da tripanossomíase americana diagnosticados em Bambuí, município do oeste mineiro. O texto, que constitui um marco nos estudos sobre a doença de Chagas no Brasil, foi fruto da cooperação entre o Serviço de Estudo das Grandes Endemias (Sege), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), e o Instituto Biológico Ezequiel Dias (Ibed, criado em 1907 como filial do IOC em Belo Horizonte, incorporado ao governo estadual em 1936, e atual Fundação Ezequiel Dias). Ao promover uma ampla mobilização científica e social em torno da doença, o trabalho representou uma contribuição decisiva para a renovação do interesse pelo tema e para a superação das dúvidas que existiam, desde a década de 1920, sobre a importância médico-social e a distribuição geográfica da doença de Chagas no país.

O trabalho de Martins e seus colaboradores é indissociável da relevante atuação do Sege no sentido de dar continuidade aos estudos sobre endemias no IOC após o falecimento de Carlos Chagas, em novembro de 1934. Criado em 1937 por Evandro Chagas (filho mais velho de Carlos Chagas), e funcionando no Hospital de Manguinhos, o Sege deve ser compreendido em sua inserção no contexto histórico-social brasileiro do pós-1930. Ainda

que a modernização capitalista preconizada pelo governo de Getulio Vargas privilegiasse o mundo urbano-industrial, o desenvolvimento rural era tido como elemento relevante para assegurar o abastecimento do mercado interno, que sustentaria o novo modelo econômico de 'substituição de importações'. Conjugada a essa diretriz, estava a centralidade conferida pelo Estado ao tema do trabalho, considerado valor primordial para a construção de uma 'nova nação', que requeria trabalhadores sãos, fortes e produtivos, nas cidades e no campo (Gomes, 1988). Em Minas Gerais, a preocupação das elites com a estagnação econômica do estado, sobretudo em comparação ao vizinho paulista, tornava-as sensíveis a programas destinados a aumentar a produtividade no campo, minimizar o êxodo rural e recuperar a tradicional vocação agrícola do estado (Dulci, 1999).

Naquele contexto, a participação de pesquisadores do Sege na campanha contra o *Anopheles gambiae* (vetor da malária), realizada em 1939-1940 pela Fundação Rockefeller e pelo Ministério da Educação e Saúde no nordeste do país – reconhecida como fato notável da saúde pública brasileira e internacional (Packard & Gadelha, 1994) –, garantiu ao serviço dirigido por Evandro Chagas grande visibilidade e força política. Isso gerou novas condições para o estabelecimento de acordos com os governos estaduais a fim de implementar ações de combate às principais endemias no país.

Em outubro de 1939, o Sege firmou um plano para pesquisar a doença de Chagas em Minas Gerais, em cooperação com o Ibed. Seria conduzido por Amilcar Vianna Martins, investigador desse instituto e professor de parasitologia da Faculdade de Medicina de Belo Horizonte, juntamente com dois assistentes – Valdemar Versiani e Antonio Tupinambá – com quem Martins vinha realizando estudos sobre os vetores da doença no Estado.[1] A expectativa era a de que, ampliado para outras regiões, esse empreendimento poderia "dentro de prazo relativamente curto, fornecer noção exata da distribuição geográfica da tripanossomíase americana no Brasil e idéia precisa do verdadeiro significado médico-social desta moléstia no país".[2]

[1] Amilcar Vianna Martins (1907-1990) nasceu em Belo Horizonte e foi um dos grandes líderes da parasitologia mineira. Ingressou, em 1924, na Faculdade de Medicina de Belo Horizonte (FMBH), trabalhando no Instituto Biológico Ezequiel Dias (Ibed) como auxiliar acadêmico e, depois, pesquisador. Em 1930, tornou-se professor assistente de fisiologia daquela faculdade. Em 1939, foi aprovado em concurso para livre-docente da cadeira de parasitologia. Um ano depois, tornou-se professor catedrático de zoologia e parasitologia da Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade de Minas Gerais. Em 1943, serviu à Força Expedicionária Brasileira na Itália. Em 1947, desligou-se do Instituto Químico Biológico (antigo Ibed), para chefiar o Serviço de Endemias Rurais da Secretaria de Saúde de Minas Gerais, onde permaneceu até 1949. Em 1952, passou a atuar como perito em doenças parasitárias da Organização Mundial da Saúde (OMS). Entre 1956 e 1958, dirigiu o Instituto Nacional de Endemias Rurais (INERu), subordinado ao Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu), criado no Ministério da Saúde em 1956. O Centro de Pesquisas de Belo Horizonte, origem do atual Centro de Pesquisas René Rachou da Fiocruz, em cuja criação Martins desempenhou papel decisivo, foi um dos órgãos do INERu. Entre 1958 e 1960, foi diretor do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e, entre 1960 e 1961, esteve à frente do DNERu. Em 1966, assumiu a direção do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e, no ano seguinte, tornou-se diretor do Departamento de Parasitologia desse instituto. Em 1969, foi aposentado compulsoriamente pelo ato institucional nº 5 (AI-5), retornando às suas funções docentes em 1979. Faleceu em 1990. Ver Azevedo & Kropf (2007).

[2] Serviço de Estudo das Grandes Endemias. Exposição ao Sr. Ministro da Educação e Saúde destinada a modificar o orçamento para o Serviço em 1940. Rio de Janeiro, de 9 de novembro de 1939. Arquivo Gustavo Capanema, Série Ministério da Educação e Saúde/Saúde e Serviço Social, GC h 1935.05.27. Esse arquivo encontra-se sob a guarda do Centro de Pesquisa e Documentação de História Contemporânea do Brasil/Fundação Getulio Vargas (Cpdoc/FGV). O plano encontra-se publicado em Martins, Versiani & Tupinambá (1940: 286-287).

Em julho de 1940, os pesquisadores publicaram os primeiros resultados. Analisando dados de 118 municípios mineiros, concluíram que "os 'barbeiros' parecem existir em todo o território do Estado com exceção de pequenas áreas" (Martins, Versiani & Tupinambá, 1940: 290) e que, no caso das espécies mais freqüentes, era alta a percentagem de presença do *Trypanosoma cruzi*, o que indicava que a ocorrência de casos humanos era bastante provável em grande parte do território. Segundo Evandro Chagas, esse trabalho constituía "o primeiro passo no sentido do estudo racional da epidemiologia da doença de Chagas no Brasil".[3] Alguns meses depois, os pesquisadores encontraram dois casos agudos (nos municípios de Grão-Mogol e Luz), os primeiros registrados em Minas Gerais depois dos estudos de Carlos Chagas publicados em 1916 (Martins & Tupinambá, 1940).

Comentando a dificuldade em diagnosticar a doença num estado em que sua presença sempre havia sido estimada como extremamente alta, os autores reforçaram a importância da nova orientação que, desde a atuação da Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (Mepra), criada por Salvador Mazza em 1926, vinha permitindo superá-la: a preocupação de que a doença deixasse de ser tema de especialistas e passasse a atrair o interesse também dos clínicos, sobretudo do interior, de modo a que estes colaborassem no mapeamento da sua ocorrência (Sierra-Iglesias, 1990; Zabala, 2007; Kropf, 2008). A conjuntivite esquizo-tripanósica unilateral (conhecida como sinal de Romaña) e o chagoma de inoculação, descritos, respectivamente, por Cecílio Romaña e por Salvador Mazza, em 1935 e 1936, foram cruciais para tal perspectiva, por constituírem sinais indicativos da fase aguda da infecção, de fácil reconhecimento. A partir de então, seriam identificadas centenas de casos agudos na Argentina e em outros países (Dias, 1997).

Um aspecto central da atuação do Sege – que, com o falecimento precoce de Evandro Chagas, em novembro de 1940, foi assumido por Carlos Chagas Filho até ser incorporado, em 1942, na Divisão de Estudo de Endemias do IOC – foi justamente o empenho em divulgar amplamente os métodos de diagnóstico clínico da doença (sobretudo o sinal de Romaña)entre os clínicos, em especial os residentes no interior (Kropf, 2008). Em seu estudo sobre a distribuição geográfica dos triatomíneos em Minas Gerais, Martins e seus colaboradores enviaram circulares para "médicos, organizações sanitárias, professores, prefeitos municipais e fazendeiros do interior", informando-lhes sobre como diagnosticar a doença e solicitando que lhes remetessem barbeiros para exame (Martins, Versiani & Tupinambá, 1940: 287).

A descoberta dos casos da tripanossomíase em Bambuí resultou desse processo de divulgação. Em 1940, Antonio Torres Sobrinho, clínico daquela região, foi consultar-se em Belo Horizonte com Amilcar Martins, que lhe falou a respeito do "sinal do olho" e da importância de buscar casos agudos da doença no estado. Martins disse ao médico que, em função das pesquisas realizadas pelo Ibed, já havia examinado um barbeiro infectado pelo *T. cruzi* proveniente de Bambuí. Em outubro daquele ano, Sobrinho atendeu em seu consultório uma menina com características clínicas da fase aguda, entre elas o inchaço no olho. Remetidos os dados a Belo Horizonte, a resposta não tardou: a menina Maria Albina era o primeiro caso confirmado em Bambuí. Sobre aqueles dias, relembra Sobrinho:

---

[3] Carta de Evandro Chagas a Amilcar Vianna Martins, Rio de Janeiro, 20 de fevereiro de 1940. Fundo Evandro Chagas, grupo: pesquisa; atividade: divulgação de resultados; função: diretor do Hospital Oswaldo Cruz/superintendente do Sege/orientação técnica e científica do Ipen; notação BR RJCOC EC 04.144. Esse arquivo encontra-se sob a guarda da Casa de Oswaldo Cruz (COC/Fiocruz).

> O movimento de casos que se seguiu foi tão grande que, de 9 de outubro de 1940 a 21 de março de 1941, apenas em seis meses e meio, só pelas minhas mãos passaram dezesseis casos agudos, fora os que foram observados pelos colegas do Hospital. E quase todos foram remetidos para o devido estudo aos Institutos Oswaldo Cruz no Rio e Ezequiel Dias em Belo Horizonte.[4]

Em dezembro de 1941, foram contabilizados 25 casos, descritos minuciosamente no trabalho publicado nas *Memórias do Instituto Biológico Ezequiel Dias* (Martins, Versiani & Tupinambá, 1939-1940).[5] Tratava-se de número expressivo, visto que, em revisão da literatura publicada três anos antes, o parasitologista inglês Warrington Yorke (1937) assinalara que no Brasil haviam sido descritos até então 33 casos agudos de infecção (29 apresentados nos trabalhos de Carlos Chagas e quatro em São Paulo) e, fora do país, 113 casos.

O trabalho de Martins e colaboradores era uma resposta àqueles que, desde a célebre polêmica na Academia Nacional de Medicina, nos anos 1920, duvidaram das afirmações de Chagas sobre a importância epidemiológica da doença.[6] Numa alusão direta aos que haviam qualificado a tripanossomíase como "raridade nosográfica" (ANM, 1923: 681)[7] e ao descrédito que, a partir de então, havia cercado o assunto, os autores declaram:

> Já começa a moléstia a chamar novamente a atenção dos poderes públicos e a entrar na cogitação dos clínicos, principalmente os do interior. Consideramos urgente mostrar a verdadeira importância da moléstia de Chagas, provar objetivamente, por meio de observações numerosas, de que não se trata de moléstia rara, curiosidade nosológica, que ataca esporadicamente sertanejos de baixo nível econômico. (Martins, Versiani & Tupinambá, 1939-1940: 3-4).

Para os pesquisadores, era fundamental a disseminação, entre os clínicos do interior, dos conhecimentos que permitiam o diagnóstico da infecção, sobretudo em sua fase aguda. Comemorando os resultados "absolutamente animadores" colhidos nessa empreitada, afirmam: "Na zona mais trabalhada – o município de Bambuí – já o diagnóstico clínico e mesmo a sua confirmação pelas provas de laboratório, é feito com a maior segurança pelos médicos locais", que, por estarem "em contato direto com as populações rurais", deveriam ser alvo de uma relevante "obra de propaganda" (Martins, Versiani & Tupinambá, 1939-1940: 4, 9).

Do ponto de vista institucional, a realização e a repercussão do trabalho de Martins, Versiani e Tupinambá produziram um resultado decisivo para a continuidade dos estudos sobre a doença de Chagas, bem como para o processo de seu reconhecimento científico e social: a criação, em 1943, em Bambuí, do Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de

---

[4] Discurso de Antonio Torres Sobrinho no Hospital Nossa Senhora do Brasil em Bambuí. Bambuí, 21 de dezembro de 1979, p. 2-3. Fundo Centro de Pesquisas René Rachou, Seção Posto Avançado de Pesquisas Emmanuel Dias, caixa 03, maço 7. Esse arquivo encontra-se sob a guarda da COC/Fiocruz. Um dos fatores apontados por Martins, Versiani e Tupinambá (1939-1940: 5) para o sucesso dos estudos em Bambuí era justamente a existência de "um bem montado hospital na cidade", que permitia o afluxo de doentes da região e a realização de exames "com grande cuidado".

[5] Embora a data de publicação do referido trabalho seja 1939-1940, ele corresponde às observações feitas pelos autores até dezembro de 1941, e foi entregue para publicação em março de 1942.

[6] Sobre a polêmica em torno da doença de Chagas na década de 1920, ver Benchimol & Teixeira (1993); Chagas Filho (1993); Coutinho (1999); Kropf, Azevedo & Ferreira (2003) e Kropf (2009).

[7] A expressão foi usada por Afrânio Peixoto, principal opositor de Chagas, na polêmica travada na Academia Nacional de Medicina (ANM, 1923: 681).

Chagas (CEPMC), posto do IOC dirigido por Emmanuel Dias (discípulo e afilhado de Carlos Chagas) até seu falecimento em 1962.[8]

Contando com o forte apoio do então diretor do IOC, Henrique Aragão, o CEPMC se dedicaria a ampliar o estudo clínico da fase crônica da doença. Graças, sobretudo, à *expertise* do cardiologista Francisco Laranja, foram produzidos dados eletrocardiográficos, radiológicos e clínicos que levaram à individualização da cardiopatia chagásica crônica como principal expressão clínica da doença. Além disso, num contexto em que os inseticidas de ação residual, como o DDT, estavam em evidência no cenário internacional (Farley, 2004), ali foram produzidas as bases técnicas para a primeira campanha de combate à endemia, inaugurada pelo Ministério da Educação e Saúde em Uberaba, em 1950, mediante a aplicação de BHC nas moradias. Emmanuel Dias se tornaria um dos principais líderes da mobilização em prol do reconhecimento científico e social da endemia chagásica como "problema continental", a ser tratado como prioridade nas políticas públicas de saúde.

Na perspectiva da história da ciência, a atuação de Martins e seus colaboradores, assim como a dos demais médicos e cientistas empenhados na renovação da pesquisa sobre a doença de Chagas naquele período, é exemplar dos meandros do processo de construção e de legitimação de um fato científico no qual a dimensão cognitiva é indissociável da dimensão social. Os 'fatos' da ciência resultam da produção de um consenso em torno de enunciados científicos, cuja validação depende de sua propagação no tempo e no espaço pelo maior número possível de 'aliados'. Para tanto, os produtores desses fatos acionam múltiplos mecanismos e estratégias persuasivas, em um processo de negociação que necessariamente envolve cientistas e outros atores e esferas da vida social. É por meio dessa associação de interesses que o conhecimento científico se estabelece e se certifica como expressão da 'natureza'. Nesse sentido, define-se como uma atividade sociocognitiva e política. Política não apenas porque influenciada pelas relações de poder, mas porque a produção do conhecimento constitui em si uma forma de se fazer política, e de agir sobre o mundo (Latour & Woolgar, 1979; Latour, 2000).

Ao produzir o consenso em relação a certos enunciados a respeito da tripanossomíase americana, aquele grupo de médicos e cientistas promoveu a continuidade do trabalho de Carlos Chagas, atraindo novas gerações de pesquisadores e constituindo uma tradição científica que, cem anos depois da descoberta da doença, permanece atuante e vigorosa. As estratégias políticas de mobilização e convencimento utilizadas pelos 'pioneiros' seguem válidas hoje, para que a sociedade, os governos, os agentes econômicos e as agências internacionais reconheçam a importância de apoiar as pesquisas e as ações de combate da doença de Chagas e de outras 'doenças negligenciadas' no século XXI.

REFERÊNCIAS

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA. Sessão de 16 de novembro de 1923. *Boletim da Academia de Medicina*, 657-691, 1923.

AZEVEDO, N. & KROPF, S. P. Ciência, saúde e vida pública. *In*: KLEIN, L. (Org.). *Professor Amilcar Vianna Martins: ciência para a saúde*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2007.

[8] Emmanuel Dias esteve associado ao Sege, tendo escrito vários artigos divulgando o sinal de Romaña entre os médicos, sobretudo do interior (Dias, 1939; Chagas & Dias, 1941). Sobre o Ibed, ver Klein & Thielen (2003) e Starling, Germano & Marques (2007). Sobre o Sege e o CEPMC, ver Kropf, 2005, 2008, 2009. Sobre Emmanuel Dias, ver Kropf (2009) e Dias (2009).

BENCHIMOL, J. L. & TEIXEIRA, L. A. *Cobras, Lagartos & Outros Bichos: uma história comparada dos institutos Oswaldo Cruz e Butantan.* Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1993.

CHAGAS, E. & DIAS, E. A propósito do sinal de Romaña. *O Hospital*, 19(2): 185-189, 1941.

CHAGAS FILHO, C. *Meu Pai.* Rio de Janeiro: Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz, 1993.

COUTINHO, M. Ninety years of Chagas disease: a sucess story at the periphery. *Social Studies of Science*, 29(4): 519-549, 1999.

DIAS, E. O sinal de Romaña e sua influência na evolução dos conhecimentos sobre a moléstia de Chagas. *Brasil Médico*, 53 (42): 965-970, 1939.

DIAS, J. C. P. Cecilio Romaña, o sinal de Romaña e a doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(5): 407-413, 1997.

DIAS, J. C. P. (Org.). *Dr. Emmanuel Dias (1908-1962).* Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

DULCI, O. S. *Política e Recuperação Econômica em Minas Gerais.* Belo Horizonte: Editora UFMG, 1999.

FARLEY, J. *To Cast out Disease: a history of the International Health Division of the Rockefeller Foundation (1913-1951).* New York: Oxford University Press, 2004.

GOMES, A. M. de C. *A Invenção do Trabalhismo.* Rio de Janeiro, São Paulo: Iuperj, Vértice, 1988.

KLEIN, L. & THIELEN, E. A ciência das doenças nas Gerais: da filial de Manguinhos ao Centro de Pesquisas René Rachou. *In*: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU. *Centro de Pesquisas René Rachou: produção científica (1980-1999).* Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou, 2003.

KROPF, S. P. Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil (1943-1962). *Tempo*, 10(19): 107-124, 2005.

KROPF, S. P. En busca de la enfermedad del Brasil: los médicos del interior y los estudios sobre el mal de Chagas (1935-1956). *In*: Carbonetti, A. & GONZÁLEZ-LEANDRI, R. (Orgs.). *Historias de Salud y Enfermedad en América Latina, Siglos XIX y XX.* Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, Conicet, 2008.

KROPF, S. P. *Doença de Chagas, Doença do Brasil: ciência, saúde e nação (1909-1962).* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2009.

KROPF, S. P.; AZEVEDO, N. & FERREIRA, L. O. Biomedical research and public health in Brazil: the case of Chagas' disease (1909-1950). *Social History of Medicine*, 16(1): 111-129, 2003.

LATOUR, B. *Ciência em Ação: como seguir cientistas e engenheiros sociedade afora.* São Paulo: Unesp, 2000.

LATOUR, B. & WOOLGAR, S. *A Vida de Laboratório: a construção dos fatos científicos.* Rio de Janeiro: Relume Dumará, 1997.

MARTINS, A. V. & TUPINAMBÁ, A. Sobre dois casos agudos de moléstia de Chagas observados em Minas Gerais, Brasil. *Brasil Médico*, 54(51): 839-841, 1940.

MARTINS, A. V.; VERSIANI, V. & TUPINAMBÁ, A. Sobre 25 casos agudos de moléstia de Chagas observados em Minas Gerais. *Separata de Memórias do Instituto Ezequiel Dias*, 3/4: 3-47, 1939-1940.

MARTINS, A. V.; VERSIANI, V. & TUPINAMBÁ, A. Estudos sobre a tripanossomíase americana em Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 35(2): 285-301, 1940.

PACKARD, R. & GADELHA, P. A land filled with mosquitos: Fred L. Soper, the Rockefeller Foundation and the *Anopheles gambiae* invasion of Brazil. *Parassitologia*, 36: 197-213, 1994.

SIERRA-IGLESIAS, J. P. *Salvador Mazza, su Vida e su Obra, Redescubridor de la Enfermedad de Chagas.* San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy, 1990.

STARLING, H. M. M.; GERMANO, L. B. de P. & MARQUES, R. de C. (Orgs.). *Fundação Ezequiel Dias: um século de promoção e proteção à saúde.* Belo Horizonte: Editora UFMG, 2007.

ZABALA, J. P. *Producción y Uso de Conocimientos Científicos Vinculados a la Enfermedad de Chagas. Argentina, 1915-2000*, 2007. Tese de Doutorado, Buenos Aires, Paris: Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales-Argentina, Université Paris 1 Panthéon-Sorbonne.

YORKE, W. Chagas' disease: a critical review. *Tropical Diseases Bulletin*, 34(4): 275-300, 1937.

JULIO MUNIZ & GILBERTO DE FREITAS

Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de polissacarídeos de *Schizotrypanum cruzi* e de outros tripanossomatídeos, seu comportamento nas reações de fixação do complemento e de hipersensibilidade: os 'tests' de floculação (sublimado e formol-gel).

Revista Brasileira de Biologia, 4(4): 421-438, 1944.

Julio Muniz (1898-1975)

Protozoologista mato-grossense do Instituto Oswaldo Cruz, demonstrou a importância das reações de hipersensibilidade na patogenia da doença de Chagas e descreveu o fenômeno da hemólise condicionada, pela primeira vez observado no decorrer da prova de hemaglutinação.

Gilberto de Freitas (s.d.)

Pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, aperfeiçoou o diagnóstico sorológico como método para confirmação dos casos clinicamente suspeitos de infecção crônica pela doença de Chagas.

REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA

VOLUME 4 DEZEMBRO, 1944 NÚMERO 4

CONTRIBUIÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS PELAS REAÇÕES DE IMUNIDADE
II. Isolamento de polisacarídeos de "Schizotrypanum cruzi" e de outros Tripanosomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade. Os "tests" de floculação (sublimado e formol-gel) [1]

JULIO MUNIZ e GILBERTO DE FREITAS

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Com uma figura no texto)

Em trabalho que publicamos este ano, tivemos ocasião de fazer um estudo comparativo entre as reações de fixação de complemento e aglutinação no diagnóstico da Doença de Chagas.

No decorrer desses estudos fomos levados também a verificar o comportamento dos sôros de doentes dessa *Trypanosomiasis* em face de um precipitinogênio específico representado pela fração polisacarídeo isolada por nós do *Schizotrypanum cruzi*.

Os resultados a que chegamos são expostos agora neste trabalho, bem como aqueles obtidos com a intradermo reação e reações não específicas como a do formol-gel e o "test" do sublimado de BENNETT & KENNY.

Apresentamos também aquí os resultados dos estudos que procedemos com o fim de verificar a maneira de se comportar da fração polisacarídeo extraída não só do *Schizotrypanum cruzi* como de outros representantes da família *Trypanosomidae* quando em presença de sôros específicos preparados contra esses diversos parasitas.

ISOLAMENTO DE UM POLISACARÍDEO DE "SCHIZOTRYPANUM CRUZI" E OUTROS TRIPANOSOMÍDEOS E SEU COMPORTAMENTO NAS PROVAS DE PRECIPITINA

As reações de precipitinas têm sido propostas por vários autores para o diagnóstico das infecções por diversos tripanosomas. Assim,

---

[1] Recebido para publicação a 31 de outubro de 1944.
Trabalho da Secção de Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz.

desde 1905 MAYER obteve resultados positivos nas infecções experimentais pelo *Trypanosoma brucei*. Depois deste trabalho inicial, outros surgiram sôbre o mesmo assunto, como os de UHLENHUTH & WOITHE (1908), WINKLER & WYSCHELESSKY (1911), RUPPERT (1912), DAHMEN (1922) e FUEST (1922) tendo estes autores trabalhado com *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma equiperdum*. Mais recentemente TAGLIAFERRO & TAGLIAFERRO utilizaram esta reação para o diagnóstico das infecções pelo *Trypanosoma hippicum*.

Em relação aos precipitinogênios empregados, as técnicas têm sido as mais variadas, desde os filtrados obtidos após digestão pela tripsina, como as empregadas por MAYER, até os extratos alcoólicos empregados por DAHMEN na sua reação de precipitação de lipóides e os extratos hidro-glicerinados e formolados preparados segundo a técnica de Watson e utilizados por TAGLIAFERRO & TAGLIAFERRO.

Quanto a sensibilidade dos vários precipitinogênios, as opiniões variam conforme os autores. Asism DAHMEN e depois FUEST, gabam a qualidade do extrato alcoólico achando-o superior aos extratos aquosos, e consideram as reações de precipitina feitas com aquele precipitinogênio, superior ao da fixação do complemento no diagnóstico da "Durina". TAGLIAFERRO & TAGLIAFERRO não obtiveram bons resultados com o precipitinogênio alcoólico atribuindo esse fato à necessidade de uma diluição prévia (1/10) do mesmo, a-fim-de evitar a ação coagulante do álcool sôbre as proteinas do sôro e dão preferência ao precipitinogênio preparado segundo a técnica de Watson no seu trabalho sôbre o diagnóstico da "Murrina".

Quanto ao emprego das reações de precipitina na evidenciação das infecções pelo *Schizotrypanum cruzi* a literatura não registra mais do que a nota extremamente sumária de PACKCHANIAN (1935), na qual os resultados obtidos em infecções experimentais são relatados ao lado das pesquisas de aglutininas. Transcrevemos aquí, integralmente o que diz o referido autor em seu trabalho :

> "(4) The antigen prepared for the precipitation reaction consisted of alcoholic, aqueous and ether extracts of washed growth of *Tr. cruzi* removed from blood agar slants. This material was washed several times in Tyrode solution. The precipitation titer was low in all these antigens although it was specific and of diagnostic value".

ISOLAMENTO DA FRAÇÃO POLISACARÍDEO DO "S. CRUZI" E DE OUTROS REPRESENTANTES DA FAMÍLIA "TRYPANOSOMIDAE"

Nas nossas pesquisas um problema que desde logo se impôs foi o da verificação dos resultados das reações nas quais são empregados precipitinogênios turvos. A conclusão a que chegamos é que os precipitinogênios preparados de acordo com as técnicas acima mencionadas e

dotadas de uma turvação própria, dificultam enormemente a leitura dos resultados das reações, sobretudo quando não se realizam com grande intensidade. Este fato é agravado muitas vezes em relação a certas amostras de sôros que apresentam uma tendência à floculação quando em contacto mesmo com a simples solução fisiológica.

Pesquisas dirigidas no sentido da obtenção de precipitinogênios mais puros e livres de turvação nos conduziram a obtenção de um polisacarídeo do *S. cruzi* empregando para isso a técnica de Fuller usada com sucesso no isolamento dessa fração das bactérias.

A importância intrínseca deste fato, independente mesmo de qualquer aplicação prática imediata, levou-nos a ensaiar a extração de tais frações em outros tripanosomídeos, o que conseguimos com sucesso em *Leptomonas oncopelti, Leptomonas culicidarum, Endotrypanum schaudinni, Leishmania brasiliensis* e *Leishmania donovani.*

A única referência por nós encontrada na literatura em relação a tal assunto se refere a um trabalho de SENEKJIE (1941), que isolou um polisacarídeo da *Leishmania tropica* tendo estudado a sua aplicação no diagnóstico do "Botão do Oriente" por meio de reações cutâneas de hipersensibilidade.

As nossas amostras de polisacarídeo isoladas dos diversos tripanosomídeos acima enumerados revelaram, em relação aos "tests" químicos, um comportamento idêntico ao da fração obtida por SENEKJIE, isto é, desprovida de atividade redutora, após hidrólise pelo HCl a 25%, sôbre o reativo de Benedict e dando reações positivas com o reativo de Molisch.

Método de extração — Seguimos nas suas linhas gerais o processo de Fuller. A 0,5 cc de corpos de parasitas obtidos de culturas em meio sólido com a idade de 6 a 8 dias, libertos por meio de filtração em algodão, de qualquer fragmento de gelose e submetidos a lavagens sucessivas em soluto fisiológico, eram adicionados 1,5 cc de formamida. Após agitação, a suspensão era levada ao banho de glicerina com a temperatura de 150° pelo espaço de 10 a 15 minutos, findo o qual a suspensão era resfriada e misturada com 3 cc de álcool clorídrico (95 partes de álcool absoluto e 5 partes de ácido clorídrico N2). Essa mistura era agitada várias vezes e depois submetida a centrifugação com o fim de retirar o precipitado. O líquido sobrenadante era pipetado e colocado em tubo centrífugo e em seguida misturado com 6 cc de acetona pura. Após rápida agitação, a mistura era submetida a nova centrifugação para separar o precipitado formado pela adição da acetona. Finda esta operação o líquido sobrenadante era desprezado e o tubo com o precipitado colocado numa estufa a 37° para apressar a evaporação da acetona. Isto obtido, o precipitado era dissolvido em 3 a 4 cc de soluto fisiológico. Pela adição de algumas gotas de solução fraca de carbonato de sódio e utilisando o bromo-cresol púrpura como indicador, o líquido era neutralizado e submetido à nova centrifugação a-fim-de libertá-lo dos elementos insoluveis por acaso existentes. Esse extrato completamente límpido, representando a solução "stock" de polisacarídeo era conservado à temperatura de 5° até o momento de ser utilisado nas reações.

Trabalhando com 0,500 g de massa úmida de *Schizotrypanum cruzi* obtivemos em média 0,060 g de precipitado após a adição da acetona.

As massas de parasitas utilisadas no processo de extração foram obtidas de cultivo em meio sólido, variando a técnica de cultura de acordo com a espécie a ser estudada. Assim, para o *Schizotrypanum cruzi* a técnica utilisada foi a mesma descrita em todos os seus detalhes em trabalho que publicamos anteriormente e ao qual já nos referimos no início deste trabalho. As culturas de *Leishmania brasiliensis* e *L.donovani* foram obtidas em placas de agar nutritivo com 2% de glicose e adicionado de sangue de cavalo na proporção de 10%, ou sangue de coelho na proporção de 5% e as sementeiras procedidas em estrias, utilisando para esse fim, pincéis. As culturas de *Endotrypanum schaudinni, Leptomonas oncopelti* e *L.culicidarum* foram obtidas em tubos contendo o mesmo meio acima mencionado.

Técnica utilizada na reação de precipitina — Nas reações de precipitina empregamos sempre a prova do anel. Para isso 0,1 cc do sôro a estudar era colocado em pequenos tubos afilados do tipo comumente usado nesse gênero de reação e em seguida igual quantidade da solução "stock" do polisacarídeo a ser experimentado era deixada escorrer lentamente pela parede do tubo a-fim-de formar uma camada distinta acima daquela constituida pelo sôro. Para cada sôro a estudar era feito na mesma ocasião um tubo testemunha no qual a diluição do polisacarídeo era substituído por simples soluto fisiológico. O tubo testemunha tem por fim evitar falsos resultados pois muitos sôros se mostram capazes de flocular quando em presença de simples soluto fisiológico. Terminada esta operação os tubos eram levados a estufa a 37.º pelo espaço de 2 horas, findo o qual era procedida a leitura. Nos sôros dotados de alto poder precipitante a reação se processa rapidamente, já no fim de 2 a 5 minutos, acentuando-se cada vez mais com o decorrer do tempo, para no final das 2 horas a zona de precipitação atingir 1 a 2 cm de espessura e em seguida se estender a quase toda a camada superior, representada pela solução de polisacarídeo anteriormente límpida. Nos sôros de menor atividade, a reação se processa mais lentamente, vindo o anel a se formar na zona de separação das duas camadas no fim de 1 a 1 1/2 horas. No caso de reação negativa costumamos repetir a prova utilisando então o polisacarídeo em diversas diluições que são colocadas novamente na presença de igual quantidade do sôro em natureza. As diluições do polisacarídeo são feitas em soluto fisiológico partindo da solução "stock" utilisada no primeiro ensaio. Esta nova prova tem por fim afastar a possibilidade do resultado negativo correr por conta do chamado "fenômeno de Neisser-Wechsberg".

Os resultados das reações de precipitinas são expressos no presente trabalho da seguinte maneira :

++++ — Início da formação do anel nos primeiros 10'.
+++ — " " " " " entre 10 a 20'.
++ — " " " " " após 30'.

COMPORTAMENTO DAS FRAÇÕES POLISACARÍDEO EXTRAIDAS DE DIVERSOS REPRESENTANTES DA FAMÍLIA "TRYPANOSOMIDAE" EM RELAÇÃO A SÔROS ESPECÍFICOS PREPARADOS CONTRA ESSES DIVERSOS PARASITAS

Levando em conta a grande especificidade que apresenta os polisacarídeos bacterianos permitindo a separação de raças ou tipos dentro de uma mesma espécie de bactéria fomos levados a verificar o compor-

tamento desta fração extraida de tripanosomídeos pertencentes a gêneros e espécies diferentes. Damos a seguir a lista das diversas amostras de flagelados das quais extraimos por processo já descrito as frações polisacarídeo, utilizadas por nós em nossos ensaios :

1.º — *Schizotrypanum cruzi*, "amostra Tatú" isolada de *Dasypus sp.* e há vários anos conservada em meios artificiais de cultura.

2.º — *Schizotrypanum cruzi*, "amostra Raymunda" isolada recentemente de um caso de Doença de Chagas não tendo mais que 15 passagens em meio artificial de cultivo.

3.º — *Schizotrypanum cruzi*, "amostra M. 80" isolada pelo Dr. Nery Guimarães de um exemplar de *Didelphis marsupialis*, não tendo mais que 11 passagens em meios artificiais de cultura.

4.º — *Leishmania brasiliensis*, "amostra 14" isolada de um caso de leishmaniose tegumentar americana e mantida há bastante tempo em meios artificiais de cultivo.

5.º — *Leishmania donovani*, "amostra Mayer" recebida do Instituto de Hamburgo e há vários anos mantida no nosso laboratório nos meios artificiais de cultivo.

6.º — *Endotrypanum schaudinni*, "amostras I e II" isoladas de dois exemplares de *Cholepus didactylus* oriundos da região amazônica e há vários anos mantida em meios artificiais de cultivo.

7.º — *Leptomonas oncopelti*, "amostra XIV" isolada pelo Prof. Noguchi e há longo tempo conservada em meios artificiais de cultivo.

8.º — *Leptomonas culicidarum*, "amostra V" isolada pelo Prof. Noguchi e há longo tempo conservada em meios artificiais de cultivo.

Essas diversas amostras de polisacarídeos foram utilizadas nos "tests" de precipitina com os seguintes imune-sôros preparados em coelho e todos eles dotados de alto poder aglutinante para a amostra homóloga :

1.º — Sôro anti-*Schizotrypanum cruzi*, "amostra Tatú".
2.º — Sôro anti-*Schizotrypanum cruzi*, "amostra Raymunda".
3.º — Sôro anti-*Schizotrypanum cruzi*, "amostra M. 80".
4.º — Sôro anti-*Leishmania donovani*, "amostra Hamburgo".
5.º — Sôro anti-*Leishmania brasiliensis*, "amostra Flavio".
6.º — Sôro anti-*Endotrypanum schaudinni*, "amostra I".

A amostra "Hamburgo" de *Leishmania donovani* que serviu para o preparo de um dos imune-sôros provinha do Instituto de Hamburgo e há muitos anos vinha sendo mantida em meios artificiais de cultivo.

A amostra "Flavio" de *Leishmania brasiliensis* tinha sido recentemente isolada quando serviu para o preparo do imune-sôro. Os dados referentes às outras amostras que foram empregadas no preparo dos outros imune-sôros já figuram na lista dos polisacarídeos.

Os "tests" de precipitina foram realizados de acordo com a técnica já anteriormente descrita.

No quadro I estão expostos os resultados obtidos com os diversos ensaios por nós realizados.

QUADRO I

FRAÇÃO POLISACARIDEO ISOLADA DAS FORMAS DE CULTIVO DE:	Sôro anti-*Schizotrypanum cruzi* (amostra tatú)	Sôro anti-*Schizotrypanum cruzi* (amostra Raymunda)	Sôro anti-*Schizotrypanum cruzi* (amostra M. 80)	Sôro anti-*Leishmania donovani* (amostra Hamburgo)	Sôro anti-*Leishmania brasiliensis* (amostra Flavio)	Sôro anti-*Endotrypanum schaudinni* (amostra I)
Schizotrypanum cruzi (amostra tatú)........	++++	++++	++++	+++	+++	++
Schizotrypanum cruzi (amostra Raymunda)	++++	++++	++++	+++	+++	++
Schizotrypanum cruzi (amostra M.80)	++++	++++	++++	+++	+++	++
Leishmania brasiliensis (amostra 14).......	+++	+++	+++	++++	++++	—
Leishmania donovani (amostra Mayer).....	+++	+++	+++	++++	++++	—
Endotrypanum schaudinni (amostras I e II)	+++	+++	+++	+++	+++	++++
Leptomonas oncopelti (amostra XIV).......	—	—	—	—	—	—
Leptomonas culicidarum (amostra V)......	—	—	—	—	—	—

Ao primeiro exame dos dados acima expostos verifica-se que a fração polisacarídeo extraida das duas espécies de flagelados parasitas de intestino de invertebrados e pertencentes ao gênero *Leptomonas* não reagiram com os anti-sôros preparados com os diversos parasitas de vertebrados. Quanto a estes verifica-se que a fração polisacarídeo da *Leishmania brasiliensis* reagiu de igual maneira quando em presença do imune-sôro "homólogo" e do imune-sôro para a *Leishmania donovani,* ocorrendo idêntico fato em relação ao polisacarídeo da *Leishmania donovani.* Esses dois imune-sôros reagiram de igual maneira na presença das 3 amostras de polisacarídeo de *S.cruzi* e o polisacarídeo do *Endotrypanum schaudinni.*

Os três imune-sôros preparados contra as diversas amostras do *S.cruzi* reagiram de modo semelhante em relação ao polisacarídeo da *L.brasiliensis* e da *L.donovani* e do *Endotrypanum schaudinni.*

O sôro anti-*Endotrypanum schaudinni* reagiu fortemente com o polisacarídeo específico, fracamente com os polisacarídeos das três amostras de *S.cruzi* e não reagiu em presença dos polisacarídeos de *L.brasiliensis* e *L.donovani.*

Um fato interessante ocorre em relação aos imune-sôros das duas espécies de *Leishmania* que se mostraram capazes de reagir com o polisacarídeo do *Endotrypanum schaudinni,* demonstrando apresentar esta fração menor especificidade do que o aglutinogênio do mesmo parasita que, segundo verificação de um de nós (MUNIZ) em colaboração com MARQUES DA CUNHA, não reage em presença de aglutininas específicas para as duas espécies de *Leishmania.*

O fato do imune-sôro para o *Endotrypanum schaudinni* não reagir em presença da fração polisacarídeo isolada da *L.donovani* e *L.brasili-*

ensis, enquanto os dois imune-sôros para estes parasitas se mostram capazes de dar reações de precipitina positiva com a fração polisacarídeo do *Endotrypanum schaudinni*, faz supor a existência, na estrutura da fração polisacarídeo das duas espécies de *Leishmania*, de um componente comum ao *Endotrypanum schaudinni*, embora incapaz de reagir na prova de precipitina, dentro das condições em que foram conduzidas as experiências. Novos ensaios são necessários para esclarecer este ponto.

A manutenção por longo espaço de tempo desses flagelados em meios artificiais de cultivo não traz modificações quanto ao comportamento da fração polisacarídeo deles isolada quando em presença dos imune-sôros nas provas de precipitina, como demonstram os resultados que obtivemos com os polisacarídeos extraidos das amostras "Raymunda" e "M. 80" de *Schizotrypanum cruzi* que tinham sido recentemente isoladas e o da amostra "Tatú" que há muitos anos vem sendo mantida em cultura. Os imune-sôros preparados com essas amostras apresentaram o mesmo comportamento em relação aos diversos polisacarídeos com os quais foram ensaiados.

COMPORTAMENTO DOS SÔROS DE CASOS AGUDOS E CRÔNICOS DE DOENÇA DE CHAGAS EM RELAÇÃO AO POLISACARÍDEO DO "SCHIZOTRYPANUM CRUZI"

Reação de precipitina — Nestes ensaios trabalhamos com 20 sôros humanos de casos de *Trypanosomiasis* americana, sendo seis colhidos na fase aguda da doença e 14 na fase crônica. Todos os casos aquí estudados provinham da cidade de Bambuí, Estado de Minas Gerais, com exceção de um nascido em Lassance, nesse mesmo Estado, mas há muito tempo residente no Distrito Federal. O diagnóstico de todos os casos agudos foi estabelecido pela verificação do parasita no exame direto do sangue. A maioria dos casos crônicos apresentam xeno-diagnóstico positivo, com exceção de um, cujo xeno, apesar de repetido várias vezes, permaneceu negativo.

Todos os sôros com que trabalhamos fixam fortemente o complemento quando em presença do antígeno específico, preparado de acordo com a técnica de Davis.

O poder aglutinante dos mesmos em relação ao *Schizotrypanum cruzi* foi determinado utilizando-se para isso de uma suspensão viva preparada com uma amostra há muito tempo conservada em nosso laboratório em meios artificiais de cultivo e denominada amostra Tatú (*Dasypus sp.*).

No quadro abaixo (Quadro II) acham-se expostos os resultados das verificações não só do poder aglutinante desses diversos sôros como do poder precipitante dos mesmos em relação à fração polisacarídeo extraí-

QUADRO II

REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO E PRECIPITINA

N.º	NOMES	CASO CLINICO	RESULTADO DO XENO-DIAGNOSTICO	AGLUTINAÇÃO COM *Schizotrypanum cruzi* "AMOSTRA TATU"									REAÇÃO DE PRECIPITINA COM POLISACARIDEO
				1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	
1	Oswaldo Barbosa	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 2-2-1944		+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	++++
2	Roldão Garcia	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 3-3-1944		+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	++++
3	Raymunda Maria de Souza	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 13-12-1943		++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	—	++++
4	Expedito Chaves Campos	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 13-12-1944		+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	—	++++
5	Nazareth Maria de Jesus	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 28-3-1944		++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	+++
6	Nilza Lobato	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 25-6-1944		++	++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++
7	Lucilio	Nascido em Lassance	Vários negativos	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	+++
8	Jovina Maria de Jesus	Caso crônico apresenta arritmia extrassistólica		++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	—	—	+++
9	Aparecida Mello	Caso crônico D. C.	Positivo em 4-8-1943	++++	++++	++++	+++	+++	++	—	—	—	+++
10	Messias José Martins	Caso crônico D. C.	Positivo em 15-12-1943	++	++	+++	+++	+++	++	—	—	—	+++
11	Manoela Fernandes	Caso crônico D. C.	Positivo em 4-6-1944	++	++	++	+++	+++	++	—	—	—	Negativo
12	Tereza Maria de Jeus	Caso crônico D. C.	Positivo em 15-7-1944	++	++	+++	++	+	—	—	—	—	Negativo
13	Ana Maria de Jesus	Caso crônico D. C.	Positivo em 25-5-1944	++	++	+++	++	+	—	—	—	—	Negativo
14	Maria José Calodina Conceição	Caso crônico D. C.	Positivo em 25-5-1944	++	++	++	+++	+++	+++	++	—	—	Negativo
15	José Roberto Moraes	Caso crônico D. C.	Positivo em 25-5-1944	++++	++++	+++	+++	+++	++	—	—	—	Negativo
16	Maria Albina da Silva	Caso crônico D. C.		++++	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	++
17	Moacyr dos Anjos	Caso crônico D. C.	Positivo em 20-3-1944	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—	—	Negativo
18	Antonieta Magalhães	Caso crônico D. C.	Feito em 1-9-44, sem resultado	++++	++++	++++	+++	+++	++	—	—	—	Negativo
19	Benevenuto Alves	Caso crônico D. C.	Positivo	++++	++++	++++	+++	++	++	—	—	—	Negativo
20	Elias Chaves	Caso crônico D. C.	Positivo em março de 1943	++	++	+++	+++	++	—	—	—	—	Negativo

da de três amostras de *Schizotrypanum cruzi,* isoladas de casos humanos (amostras Raymunda, Elvira e Expedito) segundo técnica anteriormente descrita.

Pelos resultados obtidos verifica-se que todos os seis sôros oriundos de casos agudos da *Trypanosomiasis* americana deram reações de precipitina positivas, sendo que cinco deles reagiram fortemente (++++) e um menos intensamente (+++).

Dos 14 sôros oriundos de casos crônicos, somente seis deram resultados positivos sendo quatro com +++ e dois com ++.

Uma estreita relação entre o teor em aglutininas e a intensidade da reação de precipitina pode ser verificado nos sôros dos casos agudos.

Queremos chamar aquí a atenção que as amostras de sôros dos doentes Oswaldo Barbosa e Nilza Lobato, com as quais trabalhamos nestes ensaios, foram obtidas vinte e poucos dias após o aparecimento dos primeiros sintomas (manifestações oculares) da doença.

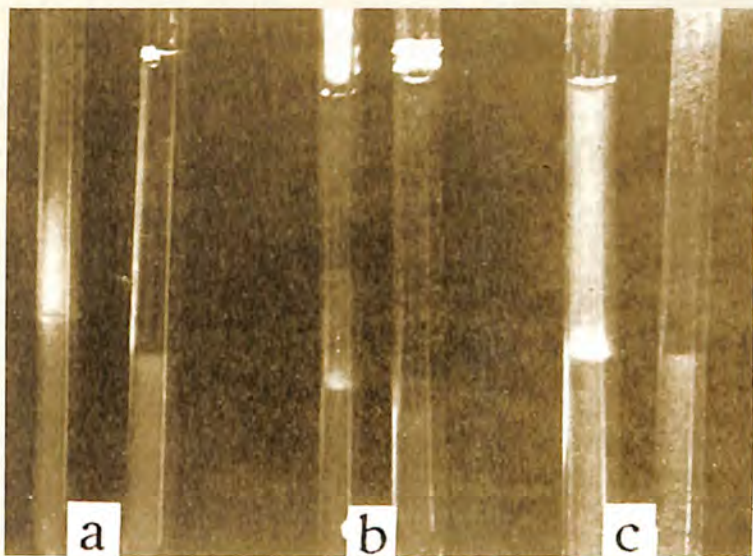



Fig. 1 — Fotografia das provas de precipitinas realizadas com os sôros de Nilza Lobato (a), caso agudo de D. C., Lucílio (b), caso crônico de D. C. e com um imune-sôro para "Amostra Tatú" de *Schizotrypanum cruzi* (c), em presença de polisacarídeo específico. Os tubos da esquerda são os da reação e os da direita são os testemunhos.

No decorrer de seis meses pudémos verificar em relação ao doente Oswaldo Barboza que o seu sôro continuava dotado de alto poder aglutinante, bem como precipitando fortemente a fração polisacarídeo.

O sôro n.º 7 que deu uma reação de precipitina positiva e que se mostrou capaz de aglutinar o *Schizotrypanum cruzi* no título de 1/2560, bem como de fixar fortemente o complemento em presença do antígeno específico, provém de um auxiliar do nosso Instituto nascido em Las-

sance (zona em que grassa endemicamente a *Trypanosomiasis* americana) mas há muito tempo morando no Distrito Federal. Há vários anos a sua atividade no Instituto consiste em examinar exemplares de *Triatoma* utilizados nas provas de xeno-diagnóstico, bem como proceder as passagens em animais, de amostras de *Schizotrypanum*. Neste caso o xeno-diagnóstico procedido várias vezes deu resultados negativos apesar das reações sorológicas falarem a favor de uma infecção.

Um entrave que costuma ocorrer na realização das provas de precipitina é representada pela tendência que certas amostras de sôros apresentam de flocular na presença de simples soluto fisiológico invalidando dessa maneira por completo a prova. Nesses casos, não só o tubo de reação como o tubo testemunho apresentam na zona de contacto uma turvação impedindo dessa maneira por completo, a interpretação do resultado. Nos sôros dotados de alto poder precipitante, quando tal fato ocorre, é possivel por comparação se notar diferença entre o tubo testemunha e o tubo de reação, mas nos sôros dando reações menos intensas isso é totalmente impossivel.

Os sôros dotados de acentuada opalescência ou, quando hemolisados, apresentam uma tendência maior à floculação que os sôros completamente límpidos, embora também estes possam apresentar tal fenômeno. Em nenhum dos sôros com os quais trabalhamos nas reações de precipitina verificamos a ocorrência do fenômeno de Neisser-Wechsberg. Todos os sôros dando reações negativas quando em presença da solução "stock" de polisacarídeo reagiram sempre da mesma maneira quando em presença de diluições crescentes da mesma solução.

Reação de fixação de complemento — Com o fim de verificar se a fração polisacarídeo por nós extraida do *Schizotrypanum cruzi* seria capaz de funcionar como antígeno nas reações de fixação de complemento e por conseguinte apresentar um comportamento idêntico ao já verificado em relação aos polisacarídeos isolados de bactérias, realizamos alguns ensaios utilizando para isso cinco sôros, sendo um de caso agudo, dois casos crônicos e dois de casos suspeitos de "Doença de Chagas". Como testemunhas usamos dois sôros com reação de Wassermann positiva.

Para um estudo comparativo, foram realizadas ao mesmo tempo, com todos esses sôros, reações de fixação em presença de um antígeno preparado de acordo com a técnica proposta por DAVIS, que na nossa opinião expressa em trabalho já publicado, constitue o antígeno que melhor resultado proporciona nesse tipo de reação, utilizada para fim diagnóstico da *Trypanosomiasis* americana.

Os ensaios preliminares feitos para determinar o poder anti-complementar da fração polisacarídeo demonstraram ser ela desprovida desse poder, mesmo quando empregada em alta concentração diferenciando-se dessa maneira de todos os outros antígenos, mesmo daquele,

como o de Davis, que menor poder anti-complementar apresenta. Nestes ensaios o antígeno representado pela fração polisacarídeo foi preparado diluindo 50 miligramos do precipitado formado após a adição da acetona em 15 cc de soluto fisiológico, sendo neutralizado em seguida por meio de uma solução fraca de carbonato de sódio, conforme técnica anteriormente descrita.

Nas reações de fixação empregamos a técnica quantitativa e os resultados acham-se expostos logo a seguir (Quadro III).

A análise dos resultados obtidos demonstra que a fração polisacarídeo, quando em presença de amboceptor específico, é dotada de alto poder fixador, superando mesmo em relação a certos sôros os resultados obtidos com o antígeno de Davis (sôros de Nilza Lobato e Lucilio).

O polisacarídeo, quando em solução rigorosamente neutra, conserva bem as suas propriedades desde que seja mantido em baixa temperatura (5° C) e livre de contaminação por bactérias e cogumelos.

Apesar de sermos de opinião que a técnica proposta por Davis resolveu a maioria das dificuldades que se apresentavam na obtenção de um antígeno a ser utilizado nas reações de fixação de complemento para a *Trypanosomiasis* americana, acreditamos que o emprego da fração polisacarídeo com idêntico fim possa trazer reais vantagens, por representar um antígeno purificado de estrutura menos complexa e dotado, não só de alto poder fixador, como desprovido de qualquer poder anti-complementar.

A prova de intradermo reação na Doença de Chagas — Embora céticos em relação ao valor dos "tests" intradérmicos no diagnóstico da Doença de Chagas, em virtude das verificações de um de nós (MUNIZ) com MARQUES DA CUNHA e já realizadas há muitos anos, resolvemos retomar o assunto presentemente, com o intuito principal de verificar o comportamento da fração em questão, nestas condições experimentais. Outros alergenos foram incluidos, para comparação.

Verificamos, assim, naquela época, que os casos crônicos de doença de Chagas não reagiam absolutamente em presença de alergenos constituidos por suspensões de formas culturais de *S. cruzi* em solução fisiológica, preservadas pela adição de 0,5 cc% de fenol ou 0,2 cc% de formol. Constatamos, ainda mais, que alguns casos que reagiram positivamente, fizeram-no com muito maior intensidade com formas culturais de *L. brasiliensis*, que com o alergeno homólogo.

Nestes últimos anos apareceram alguns trabalhos sôbre o emprego do "test" intradérmico com o fim diagnóstico da Doença de Chagas. É assim que MAYER & PIFANO dizem ter obtido ótimos resultados com esta prova utilizando como alergeno suspensões em solução fisiológica fenicada a 0,5% das formas de cultura do *Schizotrypanum cruzi* desenvolvidas em meio de N N N.

QUADRO III

PROVA DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

NÚMEROS DOS SOROS	NOMES	CASO CLÍNICO	ANTÍGENO DE *S. cruzi* — TÉCNICA DE DAVIS						POLISACARÍDEO DO *S. cruzi*					
			Títulos do sôro						Títulos do sôro					
			1/2	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/2	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
1	Nilza Lobato...................	Caso agudo D. C.	++++	++++	++++	++++	+++	—	++++	++++	++++	++++	++++	+++
2	Lucilio........................	Caso crônico D. C.	++++	+++	++	—	—	—	++++	++++	++++	+++	—	—
3	Maria José Calodina Conceição....	Caso crônico D. C.	++++	++++	+++	++	+	—	++++	++++	+++	—	—	—
4	Antonio de Souza..............	Caso suspeito D. C.	++++	—	—	—	—	—	++++	—	—	—	—	—
5	José Candido..................	Caso suspeito D. C.	+++	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	—	—
6	C. D..........................	Wassermann positivo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	O. M..........................	Wassermann positivo.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Mazza & Jörg, empregando autolizados preparados de acordo com técnica especial, obtiveram reações alérgicas cutâneas em doentes dessa *Trypanosomiasis*. Pessôa & Cardoso, ao contrário dos pesquisadores acima citados, obtiveram resultados negativos em dois casos de Doença de Chagas nos quais praticaram esse "test".

Senekjie, trabalhando com coelhos imunizados contra o *Schizotrypanum cruzi*, obteve reações positivas após inoculação por via intradérmica de suspensão de culturas desse parasita.

Material e método — Em vista dos resultados contraditórios apresentados pelos pesquisadores acima citados e que se ocuparam ultimamente dessa questão resolvemos ensaiar, ao lado da fração polisacarídeo, alergenos preparados por diferentes técnicas e que passamos a enumerar.

1.º — Autolisado obtido em baixa temperatura de uma suspensão de 0,5 g de formas de *Schizotrypanum cruzi* desenvolvidas em meio sólido e submetidas a várias lavagens em 10 cc de soluto fisiológico. Essa suspensão no decorrer de 10 dias era submetida a vários congelamentos e degelos. Findo esse prazo a suspensão era submetida a uma centrifugação violenta com o fim de retirar os restos de parasitas em suspensão. O liquido opalescente, após as provas de esterilidade, era fechado em ampolas esterilizadas e guardado a temperatura de 5º C.

2.º — Suspensão de formas de cultura em meio sólido do *Schizotrypanum cruzi* em soluto fisiológico contendo mertiolato de sódio na proporção de 1/10.000. No preparo dessa suspensão foi empregada a mesma técnica para o preparo do antigeno de Davis. A concentração de parasitas na suspensão era de 0,002 g de corpos úmidos por centimetro cúbico.

3.º — Suspensão de formas de cultura em meios sólidos do *Schizotrypanum cruzi* em soluto fisiológico contendo 0,5 cc por % de ácido fênico. A concentração do parasita era a mesma do n.º 2.

4.º — Suspensão de formas de cultura em meios sólidos do *Schizotrypanum cruzi* em soluto fisiológico contendo 0,2 por % de formol. A concentração de parasita por cc. idêntica ao do n.º 2.

5.º — Solução "stock" da fração polisacarídeo extraida de formas de cultura do *Schizotrypanum cruzi* em meio sólido. A técnica de extração empregada foi a mesma descrita no inicio desse trabalho.

No preparo desses diversos alergenos foram utilizadas 5 amostras de *Schizotrypanum cruzi*, das quais 4 eram raças humanas e tinham sido recentemente isoladas, e a outra, raça Tatú isolada de *Dasypus sp.* e há muitos anos conservada em meios artificiais de cultura.

Todas essas amostras entram na mesma proporção no preparo dos diversos alergenos.

A quantidade de alergeno injetada por via intradérmica foi de 0,1 cc.

Os doentes que serviram para nossos ensaios provinham de Bambuí, Estado de Minas Gerais e se achavam internados no Hospital Evandro Chagas do nosso Instituto. Dois deles eram casos crônicos e apresentavam xeno-diagnóstico positivos e quatro outros se achavam na fase aguda da doença. Em cada doente os diversos alergenos foram injeta-

QUADRO IV

INTRA-DERMORREAÇÃO

N.º	NOMES	CASO CLINICO	Tipos de alergenos preparados com formas de cultura do *Schizotrypanum cruzi*														
			AUTOLISADO			SUSPENSÃO FORMOLADA A 0,2%			SUSPENSÃO FENICADA A 0,5%			SUSPENSÃO EM MERTIOLATO A 1/10.000			POLISACARIDEO		
			Leitura			Leitura			Leitura			Leitura			Leitura		
			½ hora	24 h.	48 h.	½ hora	24 h.	48 h.	½ hora	24 h.	48 h.	½ hora	24 h.	48 h.	½ hora	24 h.	48 h.
1	José Magalhães.....	Caso crônico D. C. forma cardiaca xeno positivo em 3-3-43.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Moacyr dos Anjos..	Caso crônico D C. xeno positivo em 20-3-1944	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Roldão Garcia......	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 3-3-44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Oswaldo Barbosa....	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 2-2-1944	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Expedito Chaves....	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 13-12-43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Nilza Lobato........	Caso agudo D. C. exame a fresco do sangue positivo em 25-6-44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

dos na mesma ocasião e a leitura da reação praticada com 30 minutos, 24 horas e 48 horas. Os resultados acham-se expostos no quadro a seguir (Quadro IV).

Os resultados obtidos com os vários alergenos nesses 5 casos de *Trypanosomiasis* americana falam a favor da não existência, nessa doença, de um estado alérgico em relação às formas do parasita desenvolvido nas culturas. A fração polisacarídeo comportou-se de igual maneira que os alergenos preparados de corpos integrais do parasita.

Não achamos explicação para a diferença de resultados que obtivemos e os conseguidos por MAYER & PIFANO com emprego de alergenos constituidos por simples suspensão de formas de cultura em soluto fisiológico fenicado a 0,5%

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A REAÇÃO DO "SUBLIMADO" E DO "FORMOL GEL" NA DOENÇA DE CHAGAS

No decorrer dos nossos estudos tivemos ocasião de executar em 18 sôros de indivíduos portadores da *Trypanosomiasis* americana os "tests" do "formol gel" e de "sublimado (BENNETT-KENNY)". Desses 18 sôros, 17 provinham de casos crônicos e um de doente na fase aguda. Na leitura do "test" de sublimado usamos a técnica aconselhada por TAGLIAFERRO & TAGLIAFERRO, isso é : Proceder a leitura em três tempos, imediatamente após a adição do sôro, uma hora e três horas depois. Trabalhamos com as diluições de sublimado nos títulos de 1/20000 e 1/25000.

Resultados — No "test" do "formol gel" nenhum dos sôros apresentou turvação nem gelificação após a adição do formol. Quanto ao "test" do "sublimado" só quatro sôros apresentaram formação de precipitado no fim de três horas sendo que em dois o precipitado, após sedimentação, ocupava a metade da camada líquida (++), enquanto nos outros dois apenas um terço (+).

Os dois sôros que deram reação fortemente (++)), um provinha do doente na fase aguda e o outro de um caso cujo início da infecção datava de 4 meses. Os dois outros sôros que deram reação fracamente (+) provinham de casos crônicos.

Diante do comportamento dos sôros de doentes da *Trypanosomiasis* americana em relação ao "test" do "formol gel" achamos poder esta prova ser de utilidade no diagnóstico diferencial entre a Doença de Chagas e a Leishmaniose visceral, já verificada em várias regiões do Brasil. Quanto ao "test" do "sublimado" achamos necessário maior número de verificações com sôros de casos agudos, ou de indivíduos recentemente infetados, antes de se poder fazer um juizo definitivo sôbre o seu valor ; entretanto, em relação aos casos crônicos podemos concluir, pelos resultados obtidos, não ter ela nenhum valor.

CONCLUSÕES

Prosseguindo no estudo crítico dos diferentes métodos laboratoriais para o diagnóstico da Doença de Chagas, descrevemos no presente trabalho a extração de um polisacarídeo de *Schizotrypanum cruzi* e de outros tripanosomídeos, seu comportamento como antígeno nos "tests" de precipitina e de fixação do complemento, onde é comparado com o antígeno de Davis que em pesquisas anteriores se comportou como o melhor.

Provas cutâneas de hipersensibilidade foram igualmente ensaiadas no diagnóstico da Doença de Chagas, usando-se tanto o polisacarídeo como outros alergenos.

Finalmente, foram utilizadas com o mesmo fim as reações do "sublimado" e do "formol gel".

Os resultados dos trabalhos aqui relatados permitem as seguintes conclusões:

1.º — A aplicação do método de Fuller a suspensões puras de *Schizotrypanum cruzi* (3 amostras), *Endotrypanum schaudinni* (2 amostras), *Leishmania brasiliensis* (1 amostra), *Leishmania donovani* (1 amostra), *Leptomonas oncopelti* (1 amostra) e *Leptomonas culicidarum* (1 amostra), conduz ao isolamento de uma fração que se comporta como um polisacarídeo.

2.º — Este polisacarídeo mostrou-se incapaz de, após hidrólise pelo ácido clorídrico a 25%, reduzir o reagente de Benedict, mas deu positiva a reação de Molisch.

3.º — Como precipitinogênio, esta fração deu reações cruzadas com as demais espécies parasitas do homem, dando o polisacarídeo extraido de uma determinada espécie, como por exemplo *Schizotrypanum cruzi*, reações positivas, tanto com um sôro anti-*Schizotrypanum cruzi* quanto com sôros anti-*Leishmania brasiliensis* ou anti-*Leishmania donovani*, embora de menor intensidade.

Do mesmo modo se comportaram os polisacarídeos destes 2 últimos tripanosomídeos em relação aos sôros de *Schizotrypanum cruzi* (vide Quadro I).

4.º — Ao contrário do que ocorre nos "tests" de aglutinina, a conservação do protozoário durante longo tempo em meios artificiais de cultivo, não induz alterações na atividade da fração em questão, evidenciaveis pelo "test" de precipitina.

5.º — As provas cruzadas com polisacarídeo e anti-sôros do *Endotrypanum schaudinni, Leishmania brasiliensis* e *Leishmania donovani,* revelaram um fato singular cuja explicação depende de investigações mais profundas. Assim, enquanto os sôros anti-*Leishmania* reagem positivamente com o polisacarídeo extraido do *Endotrypanum schaudinni,* o sôro deste protozoário se mostrou incapaz de reagir com os polisacarídeos das duas espécies de *Leishmania,* embora reagindo fortemente com o precipitinogênio homólogo.

Em relação ao sôro anti-*Schizotrypanum cruzi* o polisacarideo do *Endotrypanum* deu reações mais intensas, que as obtidas nas reações com o sôro anti-*Endotrypanum* com o polisacarídeo de *Schizotrypanum cruzi.*

6.º — Os polisacarídeos extraidos das duas *Leptomonas* de insetos acima referidas, demonstraram um comportamento diferente, pois não reagiram com nenhum anti-sôro preparado com parasitas de vertebrados.

7.º — Os fatos acima relatados, demonstram irrefutavelmente que, ao contrário do que ocorre nas bactérias, os polisacarídeos dos tripanosomídeos não possuem qualquer especificidade de tipo ou de espécie, dando reações cruzadas com flagelados de outros gêneros da mesma família.

Cabe aquí acentuar o comportamento dos polisacarídeos de flagelados de insetos, que não deram em nenhuma ocasião reações positivas com os imune-sôros preparados com flagelados de vertebrados.

8.º — O comportamento da fração polisacarídeo de *Schizotrypanum cruzi* em presença de sôros humanos provenientes de casos de *Trypanosomiasis* americana, foi verificado num total de 20 casos, sendo 6 agudos e 14 crônicos (vide Quadro II).

Dos 6 casos agudos, todos deram reação fortemente positiva. Os sôros provenientes dos casos crônicos forneceram, porém, resultados mais variaveis, pois dos 14 sôros testados, somente seis revelaram poder precipitante em relação à fração polisacarídeo.

9.º — Como antígeno na reação de fixação de complemento, a fração polisacarídeo do *Schizotrypanum cruzi* revelou-se de alto valor, pois além de fixar fortemente o complemento quando em presença de amboceptor específico, é inteiramente desprovida de qualquer poder impediente.

10.º — "Tests" cutâneos foram ensaiados como método de diagnóstico, tendo se experimentado vários alergenos, descriminados no texto desenvolvido. Os resultados (vide Quadro IV), foram inteiramente negativos.

11.º — Finalmente, os "tests" do "formol gel" e do "sublimado", foram ensaiados em 18 sôros de doentes da *Trypanosomiasis* americana com o fim de verificar a sua praticabilidade no diagnóstico da referida doença. A reação do "formol gel" foi inteiramente negativa em todos os sôros, fato que pode constituir um elemento de valor no diagnóstico diferencial entre Doença de Chagas e Leishmaniose visceral.

Quanto ao "test" do "sublimado", resultados positivos foram obtidos apenas em 4 sôros, sendo que 2 reagiram mais fortemente (++) e dois fracamente (+). Dos que reagiram mais fortemente, um provinha de um caso agudo e outro de uma infecção datando de 4 meses. Os dois outros provinham de casos crônicos antigos.

Investigações mais extensas, em relação a sôros de casos com infecções recentes, se impõem, para um juizo mais fundamentado, embora os ensaios iniciais permitam um certo ceticismo em relação ao valor deste "test" como método de diagnóstico nessa *Trypanosomiasis*.

12.º — Pelos resultados expostos acima, pode-se concluir do valor inconteste da reação de precipitinas no diagnóstico das infecções recentes pelo *Schizotrypanum cruzi*, casos em que pode constituir um elemento a mais e de facil realização, a ser aplicado ao lado da pesquisa direta do parasita, do xenodiagnóstico e das reações de aglutinação e de fixação do complemento.

Os AA. deixam aquí consignados os seus agradecimentos ao Dr. Emmanuel Dias pela obtenção dos sôros com que trabalharam, bem como pelos numerosos dados relativos aos doentes que os forneceram; ao Dr. Gilberto Villela pelos "tests" químicos, e aos Drs. Oswaldo Peckolt e Moacir de Andrade, pelas amostras de formamida que tiveram a gentileza de sintetisar. Aos Drs. Aristides Marques da Cunha e Genard Nobrega pelas facilidades em relação aos doentes hospitalizados, e ao auxiliar da Seção, Sr. Atilio Borrielo, pelo auxilio prestado durante a realização deste trabalho.

SUMMARY

1. In this paper the AA. report the results of the isolation of a polysaccharide fraction from *S. cruzi* and other *Trypanosomidae*, its immunological behaviour and application for the diagnosis of Chagas' disease by mean of precipitin, complement fixation and cutaneous tests of hypersensibility in human cases. Precipitation tests as the "Mercuric chloride" and "Formol-gel" have been tried for the same purpose.

2. The polysaccharide fraction has been extracted from *S.cruzi*, *L.brasiliensis*, *L.donovani*, *E.schaudinni*, *L.oncopelti* and *L.culicidarum*. The method used was that of Fuller.

3. In the precipitin test (see table I), the polysaccharids of *S.cruzi*, *L.brasiliensis* and *L.donovani*, reacted with the anti-sera prepared with these species giving cross-reactions a little less intense than those between the immune serum and the homologous polysaccharide.

4. *E.schaudinni* fraction, reacted in different way. The anti-*Endotrypanum* serum reacted strongly with the homologous polysaccharide, but failed to react with this fraction from *L.donovani* as well as from *L.brasiliensis*, in spite of the sera prepared with these two flagellates being capable of reaction with the polysaccharide of *E.schaudinni*. With *S.cruzi*, cross-reactions have been observed.

5. The polysaccharide from the two species of *Leptomonas*, failed entirely to react with the anti-sera against all other species.

6. The precipitin test has been applied for diagnostic purpose, on twenty human cases of Chagas' disease (see table II), controlled by xenodiagnosis, agglutination or complement fixation tests. All six acute cases gave positive reactions, but amongst fourteen chronic ones, only six reacted positively.

7. As antigen in the complement-fixation test, the polysaccharide fraction from *S.cruzi* has proved to be of a great value, fixing intensely the complement in presence of sera from cases of american trypanosomiasis and being entirely devoid of anticomplementary activity (see table III).

8. Intra-dermal tests employing this fraction from *S.cruzi* as well as other allergens refered in the develloped text, have failed to react in all cases (see table IV).

9. Formol-gel test applied to eighteen sera from human cases of Chagas' disease, failed to give positive reactions. A such behaviour, if confirmed by further studies, can be eventually a valuable laboratory method for the differential diagnosis between Chagas' disease and visceral leishmaniasis. Mercuric chloride test (Bennett & Kenny) have been applied to the same sera. Only four cases reacted positively, two moderately (++) from recent infections and two weakly (+) from chronic cases.

BIBLIOGRAFIA

BENNETT, S. C. J. & KENNY, P. A. C., 1928, Mercuric chloride as a diagnostic agent for trypanosomiasis in camels. *J. Comp. Path.*, 41: 341-353.

FULLER, A. T., 1938, The formamide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci. *Brit. J. Exp. Path.*, 19(2): 130-139.

MAYER, M. & PIFANO, F., 1941, O diagnóstico da moléstia de Chagas por intradermo-reação com cultura de *Schizotrypanum cruzi*. *Brasil Med.*, (18): 3-5.

MAZZA, S., "et alli"., 1943, Investigaciones sobre la enfermedad de Chagas. Naturaleza histopatológica de las reaciones alérgicas cutaneas provocadas en chagasicos con lisados de cultivo de *S.cruzi*. *Mis. Est. Pat. Reg. Arg. Publ.*, 64: 143 págs.

MAZZA, S. & JÖRG, M. E., 1940, Reproducción experimental de nódulos de histiocitosis del granuloma chagásico mediante el fenómeno de Schwartzmann. *Mis. Est. Pat. Reg. Arg.*, Publ. 47: 3-18.

MUNIZ, J. & FREITAS, G., 1944, Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41 (2) (em impressão).

PACKCHANIAN, A., 1935, Agglutination and precipitation tests for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). *J. Immunol.*, 29(1): 84-85.

PESSOA, S. & CARDOSO, F. A., 1942, Nota sobre a imunidade cruzada na leishmaniose tegumentar e na moléstia de Chagas. *Hospital, Rio de Janeiro*, 21(2): 187-193.

SENEKJIE, H. A., 1941, On the polysaccharide of *Leishmania tropica*. *J. Hyg.*, 34(2): 63-66.

SENEKJIE, H. A., 1943, Immunologic studies in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. II. Slide agglutination and intradermal tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 34(2): 56-59.

TAGLIAFERRO, W. H. & TAGLIAFERRO, L. G., 1934, Complement fixation, precipitin, adhesion, mercuric chloride and Wassermann tests in equine trypanosomiasis. *J. Immunol.*, 26(3): 193-213.

WILSON, D. E., 1930, Mercuric chloride in the diagnosis of human trypanosomiasis (*T.rhodesiensis*). *J. trop. Med. & Hyg.*, 33: 217-221.

Comentário

Contribuição dos Artigos de Muniz e Freitas (1944) para o Diagnóstico Sorológico da Doença de Chagas

Tania C. de Araújo-Jorge
Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Wanderley de Souza
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ

Julio Muniz e Gilberto de Freitas deixaram seus nomes escritos na história da geração de conhecimentos para o controle da doença de Chagas, essencialmente por sua contribuição para a padronização do primeiro método a usar antígenos purificados para a detecção de anticorpos específicos para o diagnóstico sorológico dos pacientes infectados.

Estimulada pela descoberta de Chagas (1909), a pesquisa para desenvolver métodos laboratoriais de diagnóstico trilhou pelo caminho da detecção direta do parasita no sangue circulante e pela detecção de anticorpos no soro dos pacientes. Em dois anos seguidos foram publicados o primeiro teste sorológico, a reação de fixação de complemento desenvolvida por Guerreiro e Machado (1913) e o primeiro teste parasitológico, o xenodiagnóstico desenvolvido por Brumpt (1914). O xenodiagnóstico, que amplifica o parasita num vetor criado em laboratório, ainda hoje é utilizado, mas apresenta enormes restrições por sua baixa sensibilidade e pelas dificuldades técnicas e logísticas de sua implementação em inquéritos de larga escala. A reação de fixação de complemento, introduzida por Guerreiro e Machado (1913), permaneceu até a década de 1950 como único teste para detectar anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* (mais conhecida como teste de Machado Guerreiro, até hoje é oferecida na rede de laboratórios de análises clínicas) e foi usada durante muito tempo, apesar da realização muito complexa e dos muitos problemas de sensibilidade. Foram os trabalhos de Muniz e de Freitas que iniciaram a modernização das reações sorológicas de diagnóstico da doença de Chagas, nos dois artigos clássicos publicados em 1944, mesmo ano da descoberta das IgM por Waldenstrom (1944) e apenas cinco anos após a descrição das gamaglobulinas (IgG) por Tiselius e Kabat (1939).

OS RESULTADOS DE MUNIZ E FREITAS

No primeiro artigo (Muniz e Freitas, 1944a), disponível *on-line* nas *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, os autores fizeram um detalhado estudo comparativo entre as reações de aglutinação simples e de fixação de complemento, usando para isso soros de seis pacientes com doença de Chagas aguda e de 23 pacientes com doença de Chagas crônica e/ou suspeitas, todos provenientes de Bambuí, MG, e estudados clínica, epidemiológica e cardiologicamente por Emmanuel Dias e seu grupo. Nesse trabalho Muniz e Freitas concluem que a prova de aglutinação dos parasitas com soro de pacientes é tão eficiente quanto o teste de fixação de complemento e introduzem com sucesso o emprego do mertiolato para estabilizar os antígenos parasitários a serem usados nos ensaios de fixação de complemento, pois garantia maior estabilidade aos antígenos neles usados, e por períodos mais longos. Uma afirmação interessante desse artigo é a de que

> estas reações (...) não devem constituir somente assunto de pura especulação científica, mas passarem após uma necessária estandardização para o domínio dos trabalhos de rotina dos laboratórios clínicos, não só dos grandes como dos pequenos centros populosos do país, pois o estudo de tão importante endemia deve constituir preocupação constante não só dos higienistas como dos clínicos das regiões onde ela é encontrada.

Trata-se de uma defesa direta da moderna 'pesquisa translacional', que traduz resultados básicos experimentais em insumos para o sistema de saúde, sendo ao mesmo tempo um excelente exemplo de inovação tecnológica, com a preocupação de desenvolver novos métodos de diagnóstico laboratorial. Nos dias de hoje, possivelmente seria objeto de patente.

Em seu segundo artigo, reproduzido neste livro de clássicos, Muniz e Freitas (1944b) fizeram o primeiro isolamento de um polissacarídeo de *T. cruzi* e o aplicaram a ensaio sorológico, inaugurando a promissora linha de diagnóstico com antígenos mais purificados, que posteriormente veio dar origem aos modernos ensaios de hemaglutinação indireta, imunoenzimáticos (Elisa) e *western blots*. A cada 0,6g de massa úmida de parasitas, os autores conseguiam 0,05g de precipitado antigênico polissacarídico, quase 10% de rendimento. O antígeno (referido no artigo como "precipitinogênio") era obtido após fixação dos parasitas com formamida, desnaturação por calor em banho glicerinado a 150°C, resfriamento e extração álcool-ácida, seguido de precipitação com acetona pura e secagem em estufa para evaporação da acetona. Ressuspenso em solução fisiológica neutra, o extrato era "completamente límpido" e podia ser conservado a "5°C até o momento de uso nas reações". Os autores apresentam uma interessante imagem das provas de precipitina realizadas em tubos apropriados, com fácil visualização da reação de precipitação antígeno-anticorpo formada a partir dos anticorpos (referidos no artigo como "precipitinas") presentes nos soros de pacientes (fase inferior no tubo) e pela solução antigênica aplicada como fase superior do teste. Comparando os extratos de polissacarídeos com os antígenos até então usados na reação de fixação de complemento, Muniz e Freitas concluem que aqueles são excelentes, superando os demais para a identificação dos anticorpos anti-*T. cruzi*. Além disso, prepararam extratos de diferentes amostras de *T. cruzi* e de outros tripanossomatídeos, e puderam concluir que havia reações cruzadas com extratos de *T. cruzi*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania donovani* e *Endotrypanum*, mas não de *Leptomonas*. Terminam afirmando que o emprego da fração polissacarídica pode "trazer reais vantagens, por representar um antígeno purificado de estrutura menos complexa e dotado não só de um alto poder fixador como desprovido de qualquer poder anticomplementar", uma verdadeira antecipação do poder diagnóstico dos antígenos polissacarídicos, como se viria a comprovar nas décadas de 80 e 90.

OS INQUÉRITOS NACIONAIS E O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Coincidentemente, foi em 1975, quando morreu Julio Muniz aos 77 anos, que se iniciou o primeiro Inquérito Nacional de Prevalência da Doença de Chagas por Soroepidemiologia (Camargo *et al.*, 1984; Dias, Silveira & Schofield, 2002), utilizando-se a simplificação da coleta de sangue na polpa digital com lanceta descartável (sem punção venosa) e diretamente em lâmina de papel de filtro, para ser eluído e usado com os testes de hemaglutinação indireta e de imunofluorescência indireta (Camargo & Hoshimu-Shimizu, 1974). Hoje, raramente é necessário o uso de aglutinação direta de parasitas ou de fixação de complemento, pois o diagnóstico sorológico da fase crônica foi bastante aperfeiçoado e são usados em escala comercial antígenos fracionados ou recombinantes (Silveira, Umezawa & Luquetti, 2001). Com o objetivo de capturar diferentes isótipos de imunoglobulinas, em especial IgG e IgM, tais antígenos são comuns em ensaios imunoenzimáticos do tipo Elisa em placas, como em testes rápidos em tiras de nitrocelulose (Verani *et al.*, 2009). Há, inclusive, propostas de dot-Elisa para diagnóstico simultâneo de múltiplas infecções parasitárias (Santos Coelho *et al.*, 2007).

No entanto, na maior parte dos casos, as infecções agudas continuam a ser diagnosticadas com o procedimento proposto por Chagas em 1909, por detecção direta do parasita em esfregaços sangüíneos ou gota espessa. Esse teste parasitológico tem, inclusive, sido introduzido com sucesso no esquema de vigilância epidemiológica de casos de febres suspeitas de malária (Aguilar *et al.*, 2007), e, com técnicos treinados para visualização de *Plasmodium* e de *T. cruzi*, os serviços de saúde brasileiros têm aumentado a notificação de infecção aguda por este último. No entanto, essa visualização microscópica do parasita só é eficiente em presença de alta parasitemia, o que nem sempre acontece nos casos agudos em áreas endêmicas, devido ao fato de os inóculos naturais serem baixos. Disso deriva a necessidade de diagnóstico sorológico complementar na fase aguda da infecção, que é ainda um problema a demandar conhecimentos e desenvolvimento tecnológico. O ensaio usado em mais larga escala é o teste de captura de IgM em lâminas com parasitas fixados, reveladas com conjugados anti-IgM marcados para imunofluorescência, sendo o resultado expresso em positividade do soro titulada a grandes diluições (1/16 a 1/128). Em nossa experiência, tais parasitas também podem ser utilizados para detecção de IgM em placas Elisa (Antas *et al.*, 1999), desde que comparados a controles negativos e positivos. Mas, como antecipado pelos trabalhos de Muniz e Freitas, o uso de antígenos de polissacarídicos pode ter aplicação no diagnóstico, e, utilizando-se laminina de camundongo, é possível capturar anticorpos IgG anti-resíduos de galactose-α1-3-galactose (anti-Gal), que aumentam muito precocemente na fase aguda (Gazzinelli *et al.*, 1988). É, portanto, possível combinar três testes sorológicos para mapear o tempo relativo da infecção aguda (Antas *et al.*, 1999), definindo estágios agudo inicial, ainda sem a presença de IgM anti-*T. cruzi* mas com IgG anti-Gal, intermediário (com IgM e anti-Gal) e tardio (sem IgM mas com anti-Gal e com IgG específico). A estandardização de tais ensaios poderá ser de utilidade para a vigilância de casos agudos por infecções acidentais ou por via oral, que têm sido os mais comuns no Brasil atualmente (Roque *et al.*, 2008).

ATUALIDADES E PERSPECTIVAS: O PAPEL DE POLISSACARÍDEOS DE *T. CRUZI* NO RECONHECIMENTO CELULAR, NA INVASÃO, NA IMUNIDADE E NO IMUNODIAGNÓSTICO

Um destaque especial da contribuição de Muniz e Freitas deve ser dado ao estudo pioneiro visando a identificar a presença de polissacarídeos no *T. cruzi*, com alguma incursão entre os

tripanossomatídeos não patogênicos. A originalidade desse trabalho abriu uma nova linha que foi posteriormente explorada de forma magistral por vários grupos de pesquisa no Brasil e na Argentina. Já em 1969, Gonçalves e Yamaha identificaram polissacarídeos contendo glucose, manose, xilose e glucosamina. Posteriormente, os grupos liderados por Walter Colli, Rosa Lederkremer, Luis Travassos e Lúcia Mendonça Previato (Alves & Colli, 1975; Lederkremer *et al.*, 1975, Mendonça-Previato *et al.*, 1983, Previato *et al.*, 1985) avançaram significativamente, caracterizando em detalhe a presença de um número significativo de glicoconjugados, incluindo glicoproteínas, glicolipídeos, muitos dos quais associados à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (Nakayasu *et al.*, 2009). Desde a década de 80 tem sido demonstrado o importante papel desempenhado por essas moléculas localizadas na superfície do *T. cruzi* no processo de interação do parasita com a célula hospedeira (Araújo-Jorge & Souza, 1988), bem como com o epitélio intestinal do inseto vetor. No contexto desse estudo surgiu a descrição do interessante processo de controle do grau de sialização de glicoconjugados expostos na superfície celular, com a participação de uma trans-sialidase caracterizada sob o aspecto funcional pelos grupos dos Previato, de Miércio Pereira e de Sérgio Schenckman, entre outros. Outros glicoconjugados podem também ser secretados, atuando como determinantes de virulência e imunomodulação (Mendonça-Previato *et al.*, 2008).

REFERÊNCIAS

AGUILAR, H. M. *et al.* Chagas disease in the Amazon region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, supl. 1: 47-56, 2007.

ALVES, M. J. & COLLI, W. Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*: partial purification by gel chromatography. *FEBS Letters*, 52: 188-198, 1975.

ANTAS, P. R. *et al.* Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61: 308-314, 1999.

ARAÚJO-JORGE, T. C. & SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages: involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues on the recognition process. *Acta Tropica*, 45: 127-136, 1988.

BRUMPT, E. O xenodiagnóstico: aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e em particular à tripanossomose de Chagas. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia*, 3: 97-102, 1914.

CAMARGO, M. E. & HOSHINU-SHIMIZU, S. Metodologia sorológica na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista Goiana de Medicina*, 20: 47-65, 1974.

CAMARGO, M. E. *et al.* Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 26: 192-204, 1984.

CHAGAS, C. Nova tripanossomiase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, *n. gen.*, *n. sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C. & SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5): 603-612, 2002.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* Anti-laminin and specific antibodies in acute Chagas' disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 574-576, 1988.

GONÇALVES, J. M. & YAMAHA, T. Immunochemical polysaccharide from *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 39-44, 1969.

GUERREIRO, C. & MACHADO, A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Médico*, 27: 225-226, 1913.

LEDERKREMER, R. M. *et al*. A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*: isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 444: 85-96, 1975.

MENDONÇA-PREVIATO, L. *et al*. Chemical structure and antigenic aspects of complexes obtained from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry*, 22: 4.980-4.987, 1983.

MENDONÇA-PREVIATO, L. *et al*. Chemical structure of major glycoconjugates from parasites. *Current Organic Chemistry*, 12: 926-939, 2008.

MUNIZ, J. & FREITAS, G. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 41(2): 303-333, 1944a. Disponível em: <memorias.ioc.fiocruz.br/pdf/Tomo41/tomo41(f2)_303-333.pdf>.

MUNIZ, J. & FREITAS, G. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de polissacarídeos de 'Schizotrypanum cruzi' e de outros tripanossomatídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade. Os 'tests' de floculação (sublimado e formol-gel). *Revista Brasileira de Biologia*, 4(4): 421-438, 1944b.

NAKAYASU, E. S. *et al*. GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Systems Biology*, 5: 261, 2009.

PREVIATO, J. O. *et al*. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules: a proposal for a new metabolic route. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16: 85-96, 1985.

ROQUE, A. L. *et al*. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 742-749, 2008.

SANTOS COELHO, J. *et al*. A multianalyte Dot-Elisa for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58: 223-230, 2007.

SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S. & LUQUETTI, A. O. *Chagas disease: recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis. Trends of Parasitology*, 17: 286-291, 2001.

TISELIUS, A. & KABAT, E. A. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *The Journal of Experimental Medicine*, 69: 119-131, 1939.

VERANI, J. R. *et al*. Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 410-415, 2009.

WALDENSTROM, J. Incipient myleomatosis or 'essentia' hyper-globulinemia with fibrinogenemia: a new syndrome? *Acta Medica Scandinavica*, 67: 216-247, 1944.

Emmanuel Dias & José Pellegrino

Alguns ensaios com o 'Gamexanne' no combate aos transmissores da doença de Chagas.

Separata de Brasil Médico, (18-20): 1-20, 1948.

Emmanuel Dias (1908-1962)

Médico nascido no Rio Janeiro, foi diretor do Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas de Bambuí e destacou-se pela realização de importantes investigações científicas sobre a tripanossomíase americana e pelas primeiras ações de controle da doença.

José Pellegrino (1922-1977)

Sanitarista mineiro, desenvolveu pesquisas em Bambuí sobre a profilaxia da doença de Chagas. Foi professor da Universidade Federal de Minas Gerais e pesquisador do Instituto de Pesquisas René Rachou, que passou a integrar a Fundação Oswaldo Cruz em 1970.

BRASIL-MEDICO
SEPARATA

Alguns ensaios com o "Gammexane" no combate aos transmissores da Doença de Chagas

EMMANUEL DIAS e J. PELLEGRINO

"Separata" do BRASIL-MEDICO, Ano LXII, Ns. 18, 19 e 20
de 1, 8 e 15 de Maio de 1948

SODRÉ & CIA.
Rua Rodrigo Silva, 14 - 3.º
Tel. 22-1250 - Rio de Janeiro

ALGUNS ENSAIOS COM O "GAMMEXANE" NO COMBATE AOS TRANSMISSORES DA DOENÇA DE CHAGAS (*)

EMMANUEL DIAS e J. PELLEGRINO

Em vista dos notáveis resultados obtidos com o "Gammexane" (isômero gama do hexaclorociclohexana) no extermínio de insétos e outros artrópodos nocivos, empreendemos no Centro de Estudos e Profilaxia da Doença de Chagas, do Instituto Oswaldo Cruz, em Bambuí, Minas Gerais, ensaios contra os triatomas, valendo-nos do ensejo que nos proporcionou a visita do Snr. G. L. Windred, da Imperial Chemical Industries, que nos forneceu material para o inicio dos trabalhos, aos quais assistiu.

A seguir relatamos algumas das experiências feitas no laboratório e em cafúas infestadas, quase todas com o "Gammexane P 530" ou pó molhável que contém cerca de 6,5% do isômero gama. Nos ensaios de laboratório procurámos aproximar-nos o mais possivel das condições em que o inseticida tem que ser empregado na prática, utilizando-nos de superfícies de barro tratadas com o produto, afim de verificar seu poder tóxico imêdiato e residual.

1) — Uma superfície de barro lisa, de 120 cm². foi fina e regularmente pulverizada (bomba de De Vilbiss) com uma suspensão de "Gammexane P 530", de modo que a concentração de isômero gama correspondesse a 2 gr. por m². Ao todo 181 **T. infestans** (31 adultos, 155 ninfas e larvas), em pequenos lotes, permaneceram em contacto com essa superfície durante 1 minuto, sendo a seguir separados em vidros e observados, a inter-

(*) Trabalho da Divisão de Estudos de Endemias do Instituto Oswaldo Cruz.

QUADRO 1

186 **T. infestans** que estiveram durante 1 minuto em contacto com superfície de barro aspergida com "Gammexane P 530" em quantidade correspondente a 2 gr. do isômero gama por m², foram observados a intervalos variáveis até 40 horas após o contacto.

Horas de observação após contacto com o inseticida	31 "T. INFESTANS" ADULTOS				155 "T. INFESTANS" JOVENS			
	Normais	Pouco afetados	Muito afetados	Mortos	Normais	Pouco afetados	Muito afetados	Mortos
1	6	16	9		119	27	9	
1 1/2	1	3	25	2	—	—	—	—
2 1/2		2	18	9	43	96	16	
4 1/2			15	5		9	129	17
5 1/2			9	6		3	125	10
6 1/2			7	2		1	119	8
7 1/2			4	3			108	12
15				4			70	38
19							36	34
24							26	10
28							16	10
30							9	7
40							6	3

valos variáveis, até 40 horas depois. Os resultados estão no quadro 1. Todos os adultos estavam mortos ao fim de 15 horas e apenas 6 ninfas estavam vivas, muito afetadas, ao fim das 40 horas:

2) — Uma parede de barro semelhante à das cafúas, de 1665 cm² de superfície e de 9 cm. de espessura, foi construida numa armação de madeira medindo 45 por 37 por 18 cm. Um de seus lados sofreu pulverização com o pó molhável de maneira a ser obtida a concentração de 2,1 gr. de isômero gama por m². A armação foi fechada com tela de ambos os lados, sendo deixados sôbre a superfície não aspergida 93 **T. infestans** adultos e jovens. Encostado à tela do lado com inseticida ficou amarrado, do lado de fora, durante 3 noites, um frango, afim de atraír os barbeiros, que poderiam passar de um lado para outro pelas fendas da parede. Duas horas depois de iniciada a experiência já se viam barbeiros adultos caídos, afetados. Ao fim de 60 horas desmanchou-se a parede para verificação dos resultados, que se acham no Quadro 2: dos 65 adultos, 61 estavam mortos, 4 muito afetados; das 28 formas jovens, estavam mortas 9, muito afetadas 13 e normais 6.

A notar que 43 insetos mortos e muito afetados foram achados dentro da parede e 44 mortos estavam caídos ao chão. Fato semelhante seguramente ocorrerá nos expurgos feitos nas cafúas.

QUADRO 2

93 **T. infestans** foram deixados no lado não tratado de uma parede de barro fendida, sendo atraídos para o lado opôsto que foi pulverizado com 2,16 gr. de isômero gama por m²; a parede foi desmanchada 60 horas depois para verificação dos resultados.

Estadio evolutivo e n.º de barbeiros empregados		Ao cabo de 60 horas: n.º de barbeiros			
		No chão	No interior da parede		
		Mortos	Mortos	Muito afetados	Normais
Machos	32	18	11	3	0
Femeas	33	17	15	1	0
Ninfas	17	7	0	5	5
Larvas	11	2	0	8	1
Total	93	44	26	17	6

3) — Verificação da toxidez imediata e residual do Gammexane. Três caixas de madeira de 20 por 20 por 15 cm., internamente envidraçadas, receberam uma camada de barro misturado com estrume, de superfície lisa medindo 400 cm^2. Seco o barro, procedeu-se à borrifação, por meio de seringa munida de agulha fina, o mais regular possivel, do inseticida contido em 10 a 12 cc. dágua, de maneira quê as três superfícies receberam respectivamente 1 gr., 2 gr. e 3 gr. do isômero gama por metro quadrado. O líquido era ràpidamente absorvido, ficando as superfícies secas em pouco tempo. Lotes de **T. infestans** foram deixados nas caixas durante 5 e 15 minutos, procurando-se fazer com que constantemente ficassem em movimento sôbre o barro. Um mês e dois meses depois de aspergidas as caixas foram novamente usadas nas mesmas condições, tendo permanecido à temperatura ambiente, ao abrigo de poeira. Os barbeiros de cada lote foram conservados separadamente em vidros e observados cada dia, retirando-se os mortos e anotando-se as condições dos sobreviventes. Os resultados constam dos quadros 3-4-5 após cuja análise parecem cabíveis, entre outras, as seguintes apreciações: **a)** a mortalidade foi de 100% sòmente nos lotes de barbeiros que estiveram em contacto com a superfície com 3 gr. de isômero gama por metro quadrado, logo depois de aspergida; **b)** ao fim de 1 mês as superfícies de barro tratadas haviam perdido bôa parte de sua toxicidade; ao fim de 2 meses ainda havia ação residual, evidenciável pela exposição dos triatomas por tempos bem superiores aos inicialmente empregados; **c)** com o correr do tempo a atividade do inseticida vai se manifestando mais tardiamente; **d)** a ação tóxica das superfícies que receberam 2 e 3 gr. por m^2 tornou-se pràticamente equivalente (quadros 4-5); **e)** a ação do Gammexane é mais pronunciada sôbre os adultos do que sôbre as formas jovens de **T. infestans**, conforme também o demonstram as demais experiências.

4) — Para verificação comparativa da ação tóxica do Gammexane e a do DDT, e a de ambos associados, foram preparadas três caixas de madeira iguais às usadas em (3), sendo cada uma delas aspergida com **(a)** 0,5 gr. de isômero gama

QUADRO 3

Caixa G-1 — 1 gr. de isômero gama por m²

Superfície de barro de 400 cm², aspergida com quantidade de "Gammexane P 530" correspondente a 1 gr. do isômero gama por m². O número de insétos adultos e jovens mortos e despresados está assinalado após cada praso de observação.

Dias após a exposição	Pouco depois da aspersão				1 mês após		2 meses após			
	Exposição 5 min. (mortos)		Exposição 15 min. (mortos)		Exposição 15 min. (mortos)		Exposição 75 min. (mortos)		Exposição 7 horas (mortos)	
	Adultos (21)	Jovens (21)	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (20)	Jovens (20)
3	7	5	9	4	1	0	0	0	1	0
5	3	1	5	—	2	0	1	0	0	0
10	2	2	2	3	4	0	2	0	0	0
15	—	2	2	—	3	0	1	1	5	1
20	1	—	1	—	5	0	2	1	8	1
Total mortos	13	10	19	7	15	0	6	2	13	2
Sobreviventes	8	11	1	13	5	20	14	18	7	18

QUADRO 4

Caixa G-2 — 2 gr. de isômero gama por m².

Superfície de barro de 400 cm², aspergida com quantidade de "Gammexane P 530" correspondente a 2 gr. do isômero gama por m². O número de insétos adultos e jovens mortos e despresados está assinalado após cada praso de observação.

Dias após a exposição	Pouco depois da aspersão				1 mês após				2 meses após			
	Exposição 5 min. (mortos)		Exposição 15 min. (mortos)		Exposição 5 min. (mortos)		Exposição 15 min. (mortos)		Exposição 1 hora (mortos)	Exposição 3 hs. (mortos)		Exposição 5 horas (mortos)
	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (10)	Adultos (20)	Jovens (10)	Adultos (10)
3	18	6	20	15	0	2	10	2	0	3	0	1
5	2	1		—	1	2	0	3	0	1	0	1
10		3		1	1	0	5	1	2	4	0	0
15		1		1	3	1	1	4	2	4	0	2
20		1		1	4	0	1	0	2	5	1	2
Total mortos	20	12	20	18	9	5	17	10	6	17	1	6
Sobreviventes	0	8	0	2	11	15	3	10	14	3	9	4

QUADRO 5

Caixa G-3 — 3 gr. do isômero gama por m².

Superfície de barro de 400 cm², aspergida com quantidade de "Gammexane P 530" correspondente a 2 gr. do isômero gama por m². O número de insétos adultos e jovens mortos e despresados está assinalado após cada praso de observação.

Dias após a exposição	Pouco depois da aspersão				1 mês após				2 meses após			
	Exposição 5 min. (mortos)		Exposição 15 min. (mortos)		Exposição 5 min. (mortos)		Exposição 15 min. (mortos)		Exposição 1 hora (mortos)	Exposição 3 hs. (mortos)		Exposição 5 horas (mortos)
	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (20)	Jovens (20)	Adultos (10)	Adultos (20)	Jovens (10)	Adultos (10)
3	20	19	20	20	3	0	1	3	1	4	0	0
5		1			1	1	0	1	0	1	0	1
10					2	0	2	1	0	5	1	2
15					3	0	2	2	3	1	1	1
20					5	0	6	0	2	2	0	1
Total mortos	20	20	20	20	14	1	11	7	6	13	2	5
Sobreviventes	0	0	0	0	6	19	9	13	4	7	8	5

QUADRO 6

Ensaio comparativo Gammexane-DDT

Superfícies de barro de 400 cm² foram aspergidas com (a) 0,5 gr. de isômero gama por m², (b) 1,0 gr. de DDT por m² e (c) 0,5 gr. de isômero gama + 1,0 gr. de DDT por m². Lotes de **T. infestans** (10 adultos, 10 jovens) foram observados até 10 dias depois de exposição durante meia hora, 1 hora e 2 horas a essas superfícies pouco depois de aspergidas.

Dias após a exposição	(a) — 0,5 gr. de isômero gama/m² (número de mortos)						(b) — 1,0 gr. de DDT/m² (número de mortos)						(c) — 4,5 gr. de isômero + 1,0 gr. DDT/m² (número de mortos)					
	30 minutos		1 hora		2 horas		30 minutos		1 hora		2 horas		30 minutos		1 hora		2 horas	
	Adutos	Jovens	Adutos	Jovens	Adutos	Jovens	Adutos	Jovens	Adutos	Jovens	Adutos	Jovens	Adutos	Jovens	Adutos	Jovens	Adutos	Jovens
1	10	8	10	10	10	9	1	1				1	8	2	10	4	10	9
2		1					1		1	1	1							
3											1		2	3		2		
4						1	2	1	1			1		2		1		
5							1		1		1	1						
10		1					2			1				1				1
Total mortos	10	10	10	10	10	10	7	2	3	2	3	3	10	8	10	7	10	10
Sobrevi-ventes . . .	0	0	0	0	0	0	3	8	7	8	7	7	0	2	0	3	0	0

por m^2, **(b)** 1 gr. de DDT por m^2 e **(c)** 0,5 gr. de isômero gama + 1,0 gr. de DDT. Três lotes de 20 **T. infestans** cada um, sendo 10 adultos e 10 jovens, foram logo depois expostos às superfícies tratadas durante meia hora, 1 hora e 2 horas. Os insetos foram observados até 10 dias depois, constando os resultados do quadro 6. A mortalidade dos barbeiros de **(a)** foi de 100%, enquanto que a dos insetos de **(b)** foi de apenas 33% e a dos de **(c)** foi de 91,6%. Em vista do pequeno número de triatomas empregados, não se pode concluir que tenha havido uma diminuição da toxidez do Gammexane pela sua associação ao DDT.

Dentro das mesmas caixas foram deixados permanecer 10 ninfas grandes de **T. infestans,** sendo cada dia recolhidos os mortos. Ao cabo de 10 dias todas as ninfas de **(a)** e de **(c)** estavam mortas, ao passo que 8 ninfas de **(b)** ainda viviam (quadro 7).

QUADRO 7

Ensaio comparativo Gammexane-DDT

48 horas após a aspersão de superfícies de barro de 400 cm^2: (a) com 0,5 gr. de isômero gama por m^2, (b) com 1,0 gr. de DDT por m^2 e (c) com 0,5 gr. de isômero gama + 1,0 gr. de DDT por m^2, foram deixados em cada uma 10 ninfas grandes de **T. infestans,** retirando-se cada dia os mortos.

DIAS	(a)	(b)	(c)
1	5	0	9
2	4	0	0
3	1	0	1
ao cabo de 10 dias	—	2	—
Mortos	10	2	10

Vê-se assim que o Gammexane tem ação muito superior à do DDT em relação ao **T. infestans,** fato este já observado por Busvine & Barnes (1) em relação ao **Rhodnius prolixus.**

5) — Na parede interna de uma cafúa feita com tijolos de barro crú foi delimitada uma su-

perfície de meio metro quadrado, que foi finamente e regularmente pulverizada (bomba manual) com Gammexane P 530 em quantidade correspondente a 2 gr. de isômero gama por m². A pulverização foi feita de maneira a quase não haver absorção de líquido pelo barro, ficando aparentemente todo o inseticida na superfície, que se tornou esbranquiçada. Um mês e dois meses depois foram deixados em contacto com ela, durante meia hora e 1 hora respectivamente, dois lotes de 20 **T. infestans**, sendo 10 jovens e 10 adultos. O quadro 8 mostra que após 10 dias de observação

QUADRO 8

Ação residual do Gammexane. Superfície de parede de cafúa, interna, de 0,5 m², foi finamente pulverizada com 1 gr. de isômero gama (= 2,0 gr. por m²). Um mês depois da aspersão 20 **T. infestans** ficaram meia hora em contacto com a superfície e dois meses depois da pulverização outros 20 estiveram durante 1 hora em contacto com a mesma. Os insetos foram observados até 10 dias, sendo os mortos contados e separados.

Dias após a exposição	1 mês — 1/2 hora		2 meses — 1 hora	
	adultos	jovens	adultos	jovens
1	2	0	2	1
2	4	1	0	1
5	2	0	6	4
10	2	2	2	1
Total de mortos	10	3	10	7

dos insetos todos os adultos estavam mortos, havendo sobrevivido algumas formas jovens.

6) — Na localidade de Santa Juliana (Triângulo Mineiro) foram escolhidas ao acaso 8 cafúas com vestígios de barbeiro, em algumas das quais foram feitas capturas prévias. As paredes internas foram aspergidas com Gammexane P 530 (1 kg. em 18 litros dágua; ao pó juntava-se pequeno volume dágua, misturava-se bem, passava-

QUADRO 9

Casas de Santa Juliana expurgadas com "Gammexane P 530" (1 kg. e 18,1. dágua) controladas durante os 40 dias seguintes e depois deste prazo expurgadas com pó Fly-Tox.

Casa número	Expurgo com Gammexane gr. isômero gama por m²	Barbeiros capturados antes do exp. com gammexane	Capturas após expurgo com "Gammexane"			Expurgo de prova com Fly-Tox		
			Total barbeiros	Normais	Afetados	Mortos	Gramas de Fly-Tox por m²	Barbeiros capturados
37	1,0	2	7		5	2	7,7	3
39	0,5		1		1		4,0	3
44	1,0	47	18		7	11	3,0	1
74	0,8		27		15	12	5,4	72
79	0,5		133	4	30	99	3,2	174
83	0,8	265	49	2	5	42	4,3	23
84	0,4	12	118	13	25	80	4,2	279
85	0,5	74	139	40	64	35	4,5	96

se em tela e depois acrescentava-se aos poucos o restante dágua, fazendo-se a aplicação por meio de bomba aspersora Vita). As quantidades usadas variaram de 0,4 e 1,0 gr. do isômero gama por metro quadrado. As casas foram diàriamente visitadas até 40 dias depois para procura de barbeiros e outros insetos. Foram então submetidas a expurgo de prova com pó Fly-Tox (piretro), que tem notável ação sôbre os barbeiros, desalojando-os prontamente dos esconderijos (2). O quadro 9 resume os resultados observados. Se bem que houvesse capturas apreciáveis de triatomas, em seguida à aplicação do Gammexane, em todas as cafúas o expurgo de prova ainda demonstrou a presença de barbeiros. Em geral as casas expurgadas com quantidades menores de Gammexane forneceram insetos mais abundantes ao expurgo com pó Fly-Tox, o que mostra terem sido insuficientes as quantidades de inseticida empregadas. Em certos casos foram feitas capturas de barbeiros afetados e mortos durante todo o período de observação (40 dias), sendo pois provável que os insetos ainda continuassem a morrer além deste tempo, pela ação residual do Gammexane. O número total dos barbeiros apanhados após o primeiro expurgo é sem dúvida inferior ao dos que realmente foram atingidos, pois nessas e em muitas outras ocasiões foi observado que os insetos que cáem ao chão, mortos ou afetados, são imediatamente devorados por galinhas que os procuram ávidamente; além disto, há os barbeiros que morrem ou ficam muito afetados no interior das paredes de barro (v. 2). Muitos dos barbeiros apanhados afetados vieram a morrer depois de observados alguns dias no laboratório.

7) — Do mesmo modo que as precedentes, 7 cafúas de Bambuí foram expurgadas com o pó molhável, em quantidades equivalentes a 1,0 gr. do isômero gama por m². A intervalos variáveis sofreram depois a aplicação do pó Fly-Tox (quadro 10). Ao final verificou-se uma redução grande da infestação e mesmo a sua extinção em três casas. Chamamos aqui a atenção para a necessidade do contrôle destas experiências por meio de expurgos de prova eficazes ou pela destruição da cafúa para apuração do resultado definitivo.

8) — **Ação sôbre os ovos** — Vários ovos de **T. infestans** em diversas fases foram deixados sôbre uma superfície de barro que recebeu 2 gr. de isômero gama por m^2, verificando-se em todos desalagamento normal. As larvas morreram depois de entrarem em contacto com a superfície.

9) — "Smoke generators". Foi feita uma única experiência, numa pequena cafúa de Bambuí de volume aproximado de 40 m^3, na qual já haviam sido capturados muitos triatomas. Orifícios e fendas das paredes e entre a parede e o teto foram obstruídos com papel. No interior foram queimados 3 geradores de fumo n.º 2 (cada um pesa 56 gr. e contém cêrca de 9,7% de isômero gama) que queimaram pela metade. A casa ficou fechada durante pouco mais de 1 hora. No dia seguinte foram capturados 4 adultos e 8 jovens vivos e 6 jovens mortos (**T. infestans**). Dois dias após o expurgo foi feito expurgo de prova com pó Fly-Tox (600 gr.) sendo capturados mais de 300 **T. infestans** em todas as fases evolutivas. Os moradores disseram que depois da casa aberta permaneceu por várias horas um cheiro ativo e todos se queixaram de cefaléia.

Nestas condições o resultado da aplicação do "smoke generator" foi ineficiente, mas novos ensaios são necessários, em face dos bons resultados com êle obtidos por Romaña e Abalos (3) na Argentina. No nosso ensaio houve muito pouco tempo para poder ser apreciada a provável ação residual do inseticida, mas de qualquer maneira a percentagem de insetos mortos foi extremamente baixa. Parece que na prática é preferivel o expurgo com o pó molhável ao uso do gerador de fumo.

9) — **Expurgo combinado Gammexane-Piretro** — Uma cafúa muito infestada de Bambuí, na qual dias antes fora feita uma captura manual de 4 adultos e 48 formas jovens de **T. infestans**, foi submetida a várias provas. Inicialmente, a título de experiência, fez-se num quarto a aspersão (De Vilbiss) com 200 cc. de "emulsifiable Pyrenone 10-1" (piretro) a 1:40, que provocou a saída de 92 **T. infestans** (23 adultos, 69 jovens) os quais nos dias subsequentes morreram na quase

totalidade. A seguir foi feita a aplicação de Gammexane P 530 em todas as dependências na proporção de 2,3 gr. por m², que não determinou o aparecimento de triatomas. Imediatamente depois foram pulverizadas nas frestas 400 gr. de pó Fly-Tox, saindo 120 **T. infestans** e grande número de baratas que foram devoradas, bem como muitos barbeiros não computados, pelas galinhas que invadiram a casa. Nos dias imediatos os moradores enviaram 6 adultos e 21 **T. infestans** jovens. Nove dias após o expurgo foi feita primeira prova e 59 dias após segunda prova com Fly-Tox (respectivamente 800 e 600 gr.): as capturas foram de 5 adultos e 16 jovens na primeira e de apenas 2 larvas novas na segunda.

O emprego associado de Gammexane e piretrinas tem a grande vantagem de produzir uma grande baixa imediata do número de insetos, aliando-se a ação tóxica residual de um à ação imediata das outras, tendo entretanto o inconveniente do aumento do custo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseados nos resultados descritos podemos fazer algumas considerações acêrca do emprego do "Gammexane" contra os triatomas, das quais as de maior interesse são as que se seguem.

O produto sob a forma de "Gammexane P 530" (pó molhável) é o que parece ser mais aconselhável na prática, na proporção de 1 a 2 gramas de isômero gama por metro quadrado. É mais recomendável a pulverização o mais fina possível para ser obtida maior concentração do inseticida na superfície do barro que absorve muito líquido quando grosseiramente aspergido.

Como inseticida de ação residual, é o que melhores resultados tem proporcionado. Após 1 mês há uma queda sensível do poder tóxico, mas este pode durar até pelo menos 2 meses. Revelou-se bem superior ao DDT. A ação tóxica é bem mais pronunciada sôbre os barbeiros adultos do que sôbre as formas jovens, não se exercendo sôbre os ovos. Por isso e por decair com o tempo a ação residual, deve ser recomendada a repetição dos

expurgos domiciliares com 1 ou 2 meses de intervalo.

O "Gammexane" (pó molhável), não tendo ação repelente ou irritante sôbre os barbeiros e não determinando sua saída dos esconderijos dentro das paredes, com vantagem pode ser aplicado em expurgos mixtos com o pó de piretro, que a possue em grau acentuado; a aplicação combinada torna mais ràpida e mais completa a destriatomização das cafúas.

Embora não seja o produto ideal pelas suas propriedades e pelo seu custo, não resta dúvida que o Gammexane constitue um novo recurso de valor para a luta contra os transmissores da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

1 — J. R. Busvine & S. Barnes — Observations on mortality among insects exposed to dry insecticidal films — Bull. Entom. Res., vol. 38, parte 1, p. 81, 1947.

2 — E. Dias — Profilaxia da doença de Chagas — Brasil-Medico, vol. 60: 161-163, 1946.

3 — Romaña, C. & J. Abalos — Acción de los generadores de humo a base de "Gammexane" sobre los triatomideos y otros artropodos — Nota prévia. Comunicação lida na reunião de 18-4-1947 da Soc. de Biol. de Tucuman, Argentina. Copia mimeografada, 4 págs.

Reflexões sobre 'Alguns ensaios com o Gammexane no combate aos transmissores da doença de Chagas', de Emmanuel Dias e José Pellegrino, 1948: conquistas e desafios no contexto da diversidade triatomínica, cem anos após a descoberta da tripanossomíase americana

Jane Costa
Carlos Eduardo Almeida
Laboratório de Biodiversidade Entomológica
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Cleber Galvão
Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Até a descoberta da doença de Chagas em 1909, 57 espécies de triatomíneos já eram conhecidas; entretanto, as descrições feitas por vários naturalistas europeus nessa época restringiam-se aos seus aspectos morfológicos superficiais, não havendo estudos específicos sobre as características biológicas desses insetos hematófagos encontrados principalmente na América do Sul. A descoberta da tripanossomíase americana chamou a atenção para a importância dos triatomíneos; várias outras novas espécies foram descritas, e tais descrições, publicadas em várias revistas científicas, incluindo também seus ciclos biológicos e a caracterização de seus ambientes naturais (Neiva, 1910). Em 1979, 111 espécies já haviam sido descritas e sumarizadas em uma das mais notórias contribuições já apresentadas para o grupo dos triatomíneos (Lent & Wygodzinsky, 1979). Atualmente, existem 140 espécies reconhecidas de vetores da doença de Chagas (Galvão *et al.*, 2003; Forero, Weirauch & Baena, 2004; Costa, Argolo & Félix, 2006; Galvão & Ângulo, 2006; Costa & Félix, 2007; Bérenger & Blanchet, 2007; Martinez *et al.*, 2007; Sandoval *et al.*, 2007); deste total, 61 espécies ocorrem no Brasil, país onde se concentra a maior diversidade em termos de triatomíneos (Galvão *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2003). As espécies vetoras podem ser encontradas em quase toda a extensão da América Latina e parte da América do Norte. Apenas o gênero *Linshcosteus*

Distant, 1904 é endêmico do Velho Mundo, sendo encontrado exclusivamente na Índia (Lent & Wygodzinsky, 1979). Outra exceção é *Triatoma rubrofasciata* De Geer, 1773, a primeira espécie de triatomíneo descrita. Trata-se de um inseto pantropical que habita principalmente áreas portuárias, onde está associado à presença de roedores. Esse triatomíneo é freqüentemente encontrado infectado por *T. conorrhini*, que não é patogênico para o homem (Deane, 1947). Os primeiros registros sobre aspectos biológicos dos triatomíneos foram realizados por Reginaldo de Lizárraga em 1590, em regiões do Peru e do Chile (Galvão *et al.*, 2003).

Estudos indicam que a tripanossomíase americana vinha se mantendo restrita ao ambiente silvestre no continente americano, pois evidências obtidas até então sugerem que no período pré-colombiano os triatomíneos habitavam apenas os ninhos de vertebrados em seus ecótopos naturais, antes de o Brasil ser colonizado por europeus e africanos (Lent & Wygodzinsky, 1979). Entretanto, mais recentemente, múmias encontradas no Peru, no Chile e em Minas Gerais mostram que a doença de Chagas já vinha ocorrendo em comunidades de coletores e caçadores há pelo menos 4.500-7.000 anos. A disseminação da endemia, porém, ocorreu em época bem mais recente, originária de grandes movimentos populacionais, alcançando os picos de endemicidade na primeira metade do século XX (Silva, 1985; Lima *et al.*, 2008).

Nesse período, nas áreas endêmicas os vetores eram bem conhecidos pela população local, especialmente *Triatoma infestans* Klug, 1834, *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835, *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma sordida* Stål, 1859 e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa e Espínola, 1964, devido principalmente à alta densidade populacional em que ocorriam no intradomicílio em certas áreas (Dias & Zeledon, 1955). Acredita-se que o principal vetor da doença no Brasil, *T. infestans*, tenha sido introduzido por transporte passivo, a partir dos vales do Cochabamba, na Bolívia, em decorrência das grandes migrações durante os ciclos da agricultura e da pecuária, sendo, portanto, considerado uma espécie introduzida, já que não existem registros de seu encontro em ecótopos naturais nesse país. A situação calamitosa das infestações domiciliares por *T. infestans* nas áreas rurais levou um grupo de cientistas a se empenhar em resolver e controlar a transmissão vetorial. Assim, um dos marcos no controle dessa endemia foi o trabalho de Emmanuel Dias e José Pellegrino publicado em 1948, demonstrando que, através de expurgos regulares de inseticida de ação residual, Gammexane, seria possível controlar as populações dos insetos vetores nos domicílios, local onde a transmissão vetorial ocorre. Toda a base técnica dessa campanha antitriatomínica já tinha suas linhas gerais delineadas na década de 1940, com a instalação de um posto do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) em Bambuí, Minas Gerais, sob a orientação de Emmanuel Dias (Dias, 1946). Com metodologia objetiva, precisa e detalhada, esse projeto, inovador e executado com determinação, demonstrou ser exeqüível o controle vetorial domiciliar em larga escala, prognosticando a eliminação de *T. infestans*. Assim, foi possível eliminar o principal vetor em Bambuí, e logo depois o estado de São Paulo utilizou como modelo a mesma metodologia e realizou também uma campanha criteriosa e bem-sucedida (Freitas *et al.*, 1959). Os resultados obtidos tiveram grande influência não só no Brasil (Marsden *et al.*, 1994), mas também em outros países como a Argentina (Romaña & Aballos, 1948) e o Chile (Neghme & Schenone, 1962), que também seguiram as estratégias propostas por Dias e Pellegrino (1948).

Após os bem-sucedidos resultados, o principal desafio foi mobilizar as autoridades políticas em torno da importância da regularidade no tratamento químico das casas, o que impediria inúmeros casos de transmissão da doença. Desde o trabalho de Dias e Pellegrino (1948) até 1983, quando de fato teve início uma campanha de controle vetorial em nível nacional, passaram-se 35 anos. Durante esse período, campanhas de controle eram realizadas

sem um enfoque que pudesse abranger todo o território brasileiro, e muitas vezes o contingente técnico era desviado para tratar do controle de outras endemias, principalmente a malária e a dengue. Finalmente, na campanha iniciada em 1983, cerca de dois mil municípios infestados por *T. infestans* foram tratados e monitorados. As bases técnicas de Dias e Pellegrino também serviram para a extensão do programa durante 15 anos, e finalmente, em 1999, mostrou-se significativa a redução da transmissão vetorial no Brasil (Silveira & Vinhaes, 1999), que culminou com a certificação da eliminação da transmissão vetorial por *T. infestans* em 2006 (Dias, 2006).

Os cenários de transmissão da doença de Chagas desde a sua descoberta em 1909 vêm apresentando mudanças nos seus contextos epidemiológicos, em decorrência, principalmente, das rápidas e drásticas mudanças ambientais. Hoje, diversas outras espécies até então consideradas estritamente silvestres vêm modificando seus comportamentos invasivos e se adequando às condições domiciliares: *Triatoma vitticeps* Stål, 1859, *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 e *Panstrongylus lutzi* Neiva e Pinto, 1923, entre outras, vêm apresentando colônias intradomiciliares com ampla mobilidade entre o ambiente silvestre e os ecótopos antrópicos (Gonçalves *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2008; Freitas, Freitas & Gonçalves, 2004). Mais recentemente, *Triatoma sherlocki* Papa *et al.*, 2002 foi encontrada em área de mineração informal em Gentio do Ouro (região central noroeste da Bahia), formando colônias intradomiciliares (Almeida *et al.*, 2009) em um cenário peculiar: uma área remota não alcançada pelo Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCH). Chamamos a atenção também para as crescentes infestações de outras espécies já bastante estudadas, tais como *T. brasiliensis* (Costa *et al.*, 2003) nas áreas semi-áridas do Nordeste e *T. sordida* (Diotaiuti *et al.*, 1995; Pelli *et al.*, 2007), que, após as medidas para eliminar *T. infestans*, não têm recebido a devida atenção para monitoramento e controle.

Embora no Brasil as medidas para o controle vetorial visando principalmente à *T. infestans* tenham sido muito bem-sucedidas, nossa realidade requer um trabalho contínuo e determinado para que as condições propícias para a infestação domiciliar por triatomíneos sejam de fato modificadas (p. ex., substituição das casas de taipa por casas de alvenaria) e não se dependa unicamente da borrifação com inseticidas.

Como se pode observar, a história da doença de Chagas vem se transformando rapidamente diante das drásticas mudanças ambientais e sociais (Briceño-León & Galván, 2007). Apesar dos relevantes avanços obtidos no controle dessa endemia, o risco de transmissão vetorial da doença de Chagas permanece, devido principalmente a dois fatores: (i) os vetores autóctones que vêm desafiando os órgãos de saúde após o controle de *T. infestans*; e, principalmente, (ii) a manutenção de precárias condições de moradia e educação em que ainda vive boa parcela da população rural.

Hoje, comemoram-se cem anos da descoberta dessa endemia, que sem dúvida foi um marco não só para a ciência biomédica no Brasil, mas no mundo. Apesar de toda a base técnica para o seu controle, a vontade política não acompanha a capacidade de torná-la efetiva. Essa questão foi muito bem enfocada por Coura (1993), que ressalta a defasagem entre o período em que foi demonstrada a exeqüibilidade do controle de Chagas com sólidas bases técnicas (Dias & Pellegrino, 1948) e o início das campanhas propriamente ditas, em nível nacional. Sabemos que nossos desafios não são apenas políticos e econômicos. O Brasil é o maior país da América Latina, onde a diversidade não se restringe à fauna triatomínica, e apresenta também complexos contextos ecológicos e socioculturais. Continuam sendo reportadas invasões de domicílios por novas espécies de triatomíneos, cujos potenciais de transmissão ainda são

desconhecidos (p. ex., Almeida *et al.*, 2009). Na Amazônia, ainda muito pouco explorada, já se conhecem 18 espécies registradas (Coura, Barrett & Naranjo, 1994). Devastação ambiental e migrações humanas cada vez mais intensas são também fatores que influenciam positivamente na manutenção e na dispersão da endemia chagásica (Briceño-León & Galván, 2007).

Esperamos que em um futuro próximo, graças ao estudo visionário realizado em 1948 por Pellegrino e Dias, possamos comemorar a eliminação do risco vetorial, não somente por meio da aplicação de inseticidas ou da administração de drogas repelentes, mas principalmente pela melhoria das condições de moradia e mediante programas educacionais para o desenvolvimento de uma população rural saudável, atuante e crítica, que permita que de fato esse flagelo seja debelado. Esperamos que, no centenário que se segue, se exacerbe e se mobilize o espírito de cientista/cidadão, para que os atuais vetores da doença de Chagas deixem de sê-lo e se mantenham restritos aos seus ecótopos naturais, não encontrando frestas para procriar. Aliando-se a isso, é necessária a criação de ambientes educacional, social e humanamente saudáveis, mediante uma atuação integrada e sinérgica entre as comunidades rurais, científicas e políticas para a consolidação, aplicação e reavaliação de todo o conhecimento gerado desde 1948 até os resultados finais da campanha de controle de *T. infestans* (Silveira & Vinhaes, 1999; Dias, 2006). Assim poderemos atuar e vencer os novos desafios que já se apresentam.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. E. *et al.* Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 761-768, 2000.

ALMEIDA, C. E. *et al.* Could *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? *Medical and Veterinary Entomology*, 2009.

BÉRENGER, J. M. & BLANCHET, D. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 733-736, 2007.

BRICEÑO-LEÓN, R. & GALVÁN, M. J. The social determinants of Chagas disease and the transformations of Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 109-112, 2007.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen. n. sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

COSTA, J. *et al.* The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 443-449, 2003.

COSTA, J. M. & FÉLIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 87-90, 2007.

COSTA, J. M.; ARGOLO, A. M. & FÉLIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, 1.385: 47-52, 2006.

COURA, J. R. O falso dilema sobre a luta antivetorial e as perspectivas de controle da doença de Chagas no Brasil: BHC ou BNH? *Cadernos de Saúde Pública*, 9: 514-518, 1993.

COURA, J. R.; BARRETT, T. V. & NARANJO, M. A. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão chagásica? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27: 251-253, 1994.

DEANE, M. P. Ocorrência do *Trypanosoma conorrhini* em 'barbeiros' e em rato na cidade de Belém, Pará, e seu cultivo em meio de NNN. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, 1: 433-448, 1947

DIAS, E. Profilaxia da doença de Chagas: resumo das principais atividades do Centro de Estudos do Instituto Oswaldo Cruz em Bambuí, MG. *Brasil Médico*, 60: 161-163, 1946.

DIAS, E. & PELLEGRINO, J. Alguns ensaios com o gammexane no combate aos transmissores da doença de chagas. *Brasil Médico*, 62: 185-191, 1948.

DIAS, E. & ZELEDON, R. Infestação domiciliária em grau extremo por *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 53: 473-486, 1955.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cadernos de Saúde Pública*, 22: 20, 2006.

DIOTAIUTI, L. *et al.* Avaliação do programa do controle vetorial da doença de Chagas em Minas Gerais, Brasil, com referência especial ao *Triatoma sordida*. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 118: 211-219, 1995.

FORERO, D.; WEIRAUCH, C. & BAENA, M. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, 670: 1-12, 2004.

FREITAS, J. L. P. *et al.* Resultado do combate intenso dos triatomíneos domiciliares em uma área restrita do estado de São Paulo (distrito de Cássia de Coqueiros, município de Cajuru). *In*: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, 1959. Rio de Janeiro: *Anais*..., 1959. v. II.

FREITAS, S. P. C.; FREITAS, A. L. C. & GONÇALVES, T. C. M. Ocorrência de *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923) (Hemiptera: Triatominae), em três municípios do estado do Ceará, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 38: 579-580, 2004.

GALVÃO, C. & ÂNGULO, V. M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa*, 1.241: 61-68, 2006.

GALVÃO, C. *et al.* A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geografical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 202: 1-36, 2003.

GONÇALVES, T. C. M. *et al.* An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 711-717, 1998.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 163: 123-520, 1979.

LIMA, V. *et al.* Chagas disease by *Trypanosoma cruzi* lineage I in hunter-gatherer ancient population in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 1.001-1.002, 2008.

MARSDEN, P. D. *et al.* Los 13 primeros años del control de la enfermedad de Chagas en Mambaí, Goiás, Brasil, 1980-1992. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 116: 111–117, 1994.

MARTINEZ, E. *et al.* *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Boletín del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo*, 3: 1-11, 2007.

NEGHME, A. & SCHENONE, H. 1962. Enfermedad de Chagas en Chile: veinte años de investigación. *In*: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, 1959, Rio de Janeiro. *Anais*..., 3: 1.069-1.105.

NEIVA, A. Informações sobre a biologia de *Conorrhinus megistus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2: 206-212, 1910.

PELLI, A. *et al.* Population parameters for *Triatoma sordida* Stål, 1859: the most frequent vector for Chagas disease in the Triangulo Mineiro (Heteroptera, Triatominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40: 25-28, 2007.

ROMAÑA, C. & ABALLOS, J. W. Acción del 'Gamexanne' sobre los triatomideos: control domiciliario. *Anales del Instituto de Medicina Regional de Tucumán*, 2: 95-106, 1948.

SANDOVAL, C. M. *et al. Belminus ferroae n.sp.* from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, 1.443: 55-64, 2007.

SILVA, L. J. A doença de Chagas no Brasil: indícios de sua ocorrência e distribuição até 1909. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 27: 219-223, 1985.

SILVEIRA, A. C. & VINHAES, M. C. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, supl. I: 405-411, 1999.

SOUZA, R. C. M. *et al.* Population dynamics of *Triatoma vitticeps* (St l, 1859) in Itanhomi, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 14-20, 2008.

BHC, os Inseticidas como Ferramenta Central no Controle da Doença de Chagas

Marcelo Gustavo Lorenzo
Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas
Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz

BREVE RESENHA HISTÓRICA

O trabalho em que Carlos Chagas descreve o ciclo, os sintomas e o principal mecanismo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, publicado em 1909, e outros que seguiram a saga evidenciaram a séria problemática que representava a tripanossomíase americana e suas diferentes facetas. Desde aquela data, passaram-se quase quarenta anos para que fosse possível começar a desenvolver o lado técnico da metodologia central de combate à doença de Chagas: a borrifação de inseticidas sintéticos objetivando a eliminação dos insetos vetores. Essa limitação respondeu a fatores históricos que são brevemente analisados aqui.

Os historiadores têm relatado o uso de pesticidas desde a época de Homero, na Grécia, que recomendava a queima de enxofre nas casas. Plínio, o Velho (23-79 d.C.), registrou a maioria dos primeiros usos de inseticidas na sua *História Natural*. Mas até o início da II Guerra Mundial (1939), a variedade de inseticidas limitava-se a diversos produtos contendo arsênico, óleos de petróleo, nicotina, piretro de *Chrysanthemum*, rotenona, enxofre, cianeto de hidrogênio etc. Durante a II Guerra Mundial foi que se iniciou a era da química moderna, com a introdução de um novo conceito no controle de insetos: os inseticidas orgânicos sintéticos, o primeiro dos quais foi o DDT (Ware & Whitacre, 2004).

Os organoclorados são inseticidas que contêm carbono (daí o nome organo-), hidrogênio e cloro. Hoje, conservam principalmente o interesse histórico, pois somente uns poucos sobreviveram no arsenal de moléculas de utilização atual. O DDT é provavelmente o mais conhecido e notório produto químico desenvolvido no século XX. É particularmente fascinante o fato de que continua reconhecido como o inseticida mais útil jamais desenvolvido. Mais de dois bilhões de quilos de DDT foram usados no mundo desde o seu lançamento em 1940

até 1973, quando a Agência para a Proteção Ambiental dos Estados Unidos cancelou todos os seus usos no controle de pragas de alimentos e os demais países desenvolvidos seguiram rapidamente o seu exemplo. O DDT ainda é utilizado com efetividade no controle de malária em vários países do chamado Terceiro Mundo. Paul Müller, entomólogo suíço, recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1948 por sua descoberta, em 1939, desse produto que permitiu salvar muitas vidas mediante o controle de vetores da malária, febre amarela e muitas outras doenças (Müller, 1948).

O hexaclorociclohexano (BHC), conhecido também como hexaclorobenzeno, teve suas propriedades inseticidas descobertas em 1940 por entomologistas franceses e britânicos. No seu grau técnico apresenta cinco isômeros: alfa, beta, gama, delta e épsilon. Surpreendentemente, somente o isômero gama tem propriedades inseticidas. Conseqüentemente, este isômero foi isolado durante a sua produção e vendido como o inseticida inodoro Lindane. O hexaclorobenzeno ou Gammexane foi, a princípio, registrado comercialmente ao final da década de 30. Após quase sete décadas, em 2002, a Agência Estadunidense para a Proteção Ambiental (EPA) suspendeu seu uso em todos os processos relacionados com a produção de comida. Em 2009, o Lindane foi incluído na Convenção de Estocolmo (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente) para produtos orgânicos poluentes persistentes, e sua produção e uso foram banidos em escala global (Stockholm Convention..., 2009).

Surgem oportunidades

No fim da década de 1940, a possibilidade de testar um produto clorado comercial é oferecida pela Imperial Chemical Industries, um dos maiores produtores mundiais de substâncias químicas, parte de um conglomerado holandês que incluía a Nobel Industries, a Brunner, Mond and Co., a United Alkali Co. e a British Dyestuffs Corporation. O produto, denominado Gammexane, podia ser dissolvido em água e borrifado em superfícies às quais se desejara proteger. De fato, Busvine e Barnes (1947) demonstraram em ensaios de laboratório que o hexaclorociclohexano era mais efetivo que o DDT para matar vários tipos de artrópodes praga, dentre eles *Rhodnius prolixus*. No ano seguinte, Dias e Pellegrino (1948) relataram em sua histórica publicação que a aplicação de Gammexane por meio da borrifação de paredes de taipa infestadas com *Triatoma infestans* era altamente eficiente para eliminar esses insetos. Pioneiramente, esses autores escolheram avaliar o produto em casas da região rural da cidade mineira de Bambuí, MG, área previamente caracterizada como endêmica pelos estudos realizados por pesquisadores do Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas, posto avançado do Instituto Oswaldo Cruz.

Os detalhes técnicos e suas conseqüências históricas

Nesse trabalho, Dias e Pellegrino (1948) realizaram dez experimentos independentes para testar as diversas perguntas necessárias e relevantes para a avaliação de um método triatomicida. Os trabalhos tiveram grande mérito técnico e originalidade; foram escolhidas condições reais para os estudos, realizados em paredes de taipa, inclusive em casas inteiras construídas com esse material e habitadas por famílias. Todos os experimentos foram desenvolvidos sob condições ambientais naturais, expondo as moléculas em estudo aos verdadeiros efeitos climáticos e físicos que elas deveriam suportar para serem ferramentas válidas.

Em seu primeiro experimento, expondo uma simples parede de taipa que apresentava um número controlado de triatomíneos em um dos lados e Gammexane, aplicado com uma bomba manual, do outro, os autores demonstram que esse composto era altamente tóxico para *T. infestans*, o principal vetor da doença de Chagas. Ressaltavam a importância da aplicação de

uma pulverização fina, para evitar a penetração da substância e promover sua permanência na superfície. Subseqüentemente, Dias e Pellegrino mostram, em seu artigo, que é relevante afetar os triatomíneos nos seus esconderijos, dos quais dificilmente saem nas horas em que os inseticidas são aplicados (Lazzari & Lorenzo, 1998; Ferreira, 2009; Vitta, 2009). Os dados apresentados demonstravam, de fato, que o BHC apresentado em doses de 1 g/m^2 era capaz de matar os insetos quando estes saíssem dos refúgios, mesmo horas depois da aplicação. Doses menores promoviam mortalidade parcial e eram, portanto, insuficientes, segundo os autores. O trabalho desenvolvido em Bambuí já evidenciava claramente a relevância do efeito residual das moléculas xenobióticas. Os resultados mostravam que a eficiência do gammexane, expressa pelo seu poder letal, diminuía com o tempo. E que doses altas de hexaclorociclohexano perdiam sua capacidade triatomicida após períodos longos.

Ressalta-se que os dados apresentados por Dias e Pellegrino (1948) mostravam claramente que o Gammexane apresentava efeito maior sobre insetos adultos do que sobre ninfas. De maneira semelhante ao demonstrado por Busvine e Barnes (1947) em experimentos de laboratório com *R. prolixus*, Dias e Pellegrino puseram em evidência que o hexaclorociclohexano promovia mortalidade muito mais alta em *T. infestans* que o DDT, mesmo em doses equivalentes. Relatam esses autores que os resultados eram mais efetivos e confiáveis, se na sua avaliação eram utilizados agentes desalojantes para comprovar infestação residual. Inclusive recomendam utilizar o expurgo combinado com Gammexane e piretro, já que isso gerava maior efetividade, desalojando os insetos com o segundo e promovendo, dessa maneira, sua exposição ao contato com o primeiro. Finalmente, os resultados mostraram claramente a capacidade ovicida praticamente nula do BHC, apesar de relatar a morte das ninfas emergentes ao entrarem em contato com superfícies tratadas.

Na mesma época, Romaña e Ávalos (1948) realizaram testes com uma formulação semelhante de Gammexane em casas de uma região rural da Argentina infestadas por *T. infestans*. Os estudos mostraram resultados semelhantes, o que reforça o mérito desses grupos pioneiros de pesquisadores de dois dos países que viriam a compor a Iniciativa do Cone Sul, muitos anos depois de suas descobertas (Silveira *et al.*, 2002). De fato, Romaña e Ávalos (1948) avaliam que apesar de ter sido relatada a eficácia do Gammexane em oportunidade anterior pelos pesquisadores ingleses anteriormente citados (Busvine & Barnes, 1947), o fato de os testes terem mostrado efetividade com esse vetor e a falta de um inseticida eficaz contra triatomíneos nas condições naturais justificavam a comunicação dos achados. De maneira semelhante ao observado por Dias e Pellegrino (1948), os autores argentinos testaram potes fumegantes com Gammexane e mostraram que sua eficácia era muito reduzida. E coincidiram também na observação de que é absolutamente necessário retirar todos os objetos acumulados no interior das moradias, revisá-los para detectar a presença de insetos e borrifar móveis e estruturas semelhantes. Adicionalmente, recomendavam a aplicação do inseticida em galinheiros e currais vizinhos às moradias.

CONSEQÜÊNCIAS E PERSPECTIVAS

Como observado por Silveira (2000), foi nesses anos que a eficácia do controle pela borrifação sistemática de casas infestadas tornou os inseticidas a primeira alternativa a ser utilizada para eliminar a transmissão do *T. cruzi* aos humanos. Como conseqüência, algumas campanhas isoladas foram promovidas a partir de 1950 na Argentina e no Brasil. Posteriormente, a Venezuela iniciou ações de controle com inseticidas em algumas regiões.

Mas a continuidade da aplicação consistente e sistemática de inseticidas somente veio a acontecer em grandes áreas de alguns dos países latino-americanos décadas depois dessas descobertas. A causa fundamental foi a absoluta falta de interesse das classes governantes pelas populações pobres rurais, mais uma vez esquecidas e abandonadas à sua própria sorte. Cem anos depois da descoberta, infelizmente essa continua a ser a realidade em importantes áreas do nosso continente. Houve avanços, restam grandes desafios.

REFERÊNCIAS

BUSVINE, J. R. & BARNES, S. Observations on mortality among insects exposed to dry insecticidal films. *Bulletin of Entomological Research*, 38: 80-81, 1947.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi n., gen., n., sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

DIAS, E. & PELLEGRINO, J. Alguns ensaios com o 'Gammexane' no combate aos transmissores da doença de Chagas. *Brasil Médico*, 62: 185-191, 1948.

FERREIRA, R. A. *A Procura do Hospedeiro e Escolha do Sítio de Picada por um Vetor da Doença de Chagas*, 2009. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

LAZZARI, C. R. & LORENZO, M. G. Activity pattern with relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica*, 70(2): 163-170, 1998.

MÜLLER, P. Dichloro-diphenyl-trichloroethane and newer insecticides. *Nobel Lecture*, 1948.

ROMAÑA, C. & ÁVALOS, J. W. Acción del 'Gamexanne' sobre los triatomídeos: control domiciliario. *Anales del Instituto de Medicina Regional de Tucumán*, 2: 95-106, 1948.

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cadernos de Saúde Pública*, 16, supl.: 35-42, 2000.

SILVEIRA, A. C. *et al. O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América*. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 2002.

STOCKHOLM CONVENTION on Persistent Organic Pollutants, 2009. Disponível em: <chm.pops.int>. Acesso em: 30 maio 2009.

VITTA, A. C. R. *Comportamento Sexual de* Triatoma brasiliensis *(Heteroptera/ Reduviidae)*, 2009. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

WARE, G. W. & WHITACRE, D. M. *The Pesticide Book*. 6. ed. Willoughby, Ohio: Meister Media Worldwide, 2004.

SALVADOR MAZZA

La enfermedad de Chagas en la República Argentina.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 47: 273-288, 1949.

Salvador Mazza (1886-1946)

Médico argentino, destacou-se por sua atuação na Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (Mepra), criada em 1926. Desenvolveu estudos sobre a caracterização clínica (em especial da forma cardíaca aguda), a epidemiologia e o diagnóstico da doença de Chagas, tendo descrito um importante sinal para identificação de casos agudos (o 'chagoma de inoculação'). Seu trabalho é considerado decisivo para o reconhecimento da dimensão continental da doença de Chagas.

La enfermedad de Chagas en la Republica Argentina

por

Salvadcr Mazza

(Jefe de la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina de la Universidad de Buenos Aires)

Casi siguiendo al descubrimiento de la Tripanosomiasis americana realizado por CARLOS CHAGAS en Brasil, fué conocido en Argentina el padecimiento justicieramente designado después con el nombre de aquel investigador brasileño. En efecto, LOZANO, MAGGIO y ROSEMBUSCH ilustraron en forma adecuada el tema en dos conferencias profesadas en Buenos Aires durante 1911 ante la Sociedad Argentina de Higiene Pública e Ingeniería Sanitaria, donde presentaran materiales provenientes del Instituto Oswaldo Cruz, demonstrativos del parásito del insecto vector y de las principales lesiones entonces conocidas de la enfermedad de CHAGAS descubierta algo menos de dos años antes en el Estado de Minas Geraes.

Poco después, en 1914, MAGGIO y ROSEMBUSCH efectuaron comprobaciones de infestaciones naturales considerables con formas evolutivas del *Schizotrypanum cruzi* del principal y más difundido triatomíneo argentino, *Triatoma infestans*. Demostraron por inoculaciones en animales sensibles variados, la capacidad infectante de los flagelados de deyecciones de "vinchucas" del país para producir las lesiones características de la enfermedad de CHAGAS.

Esta infestación de triatomíneos argentinos, se mostró, ya desde esos primeiros estudios de MAGGIO y ROSEMBUSCH muy difundida, compreendiendo casi todo el territorio nacional con la sola exclusión de las Gobernaciones del Sur: San Juan, Entre Rios, Corrientes â Misiones no fueron entonces exploradas. Aún en las partes Norte y Oeste de la provincia Buenos Aires y en La Pampa se reconocieron para ese tiempo "vinchucas" infestadas por *Schizotrypanum cruzi.*

En la provincia Salta, MAGGIO y ROSEMBUSCH, establecieron que el 59% de *Triatoma infestans* de la Capital albergaban formas evolutivas virulentas del *S. cruzi*.

Por nuestra parte, hacia 1919 en el Laboratorio de la Sanidad Militar Argentina que entonces dirigíamos, iniciamos investigaciones sobre la infestación natural de triatomíneos argentinos, exponiendo periódicamente sus resultados en los cursos complementarios sobre protozoarios que profesábamos en la Cátedra de Microbiologia de la Facultad de Medicina de Buenos Aires.

No obstante las múltiples demonstraciones del agente productor de la enfermedad de Chagas en el país, fué sólo 10 años después (1924) que, MÜHLENS y colaboradores reconocieron en Argentina seres humanos com el tripanosoma de la enfermedad de CHAGAS en la circulación sanguínea.

Se trataba de 2 niños cuyas sangres fueron examinadas microscópicamente para establecer índices plasmodiales de paludismo: pertenecía uno a la provincia Tucumán y otro a Jujuy.

En ambos casos la ausencia de síntomas alarmantes o groseramente aparentes, hizo que se consideraran sólo "portadores" de *S. cruzi* a estos sujetos, así como a otros que ulteriormente se reconocieron con relativa frecuencia en el país, consecutivamente a estos ocasionales exámenes de sangre en gota gruesa de componentes de poblaciones del interior.

En 1926 determinamos al perro (*Canis familiaris*) en la provincia Jujuy, como portador natural de *S. cruzi* en los domicilios con gran infestación de triatomíneos.

También en ese mismo año hallamos el primer adulto (23 años) con *S. cruzi* en la circulación y además infección malárica asociada. En este caso la frecuencia de 110 del pulso, hipotenso, con auscultación de desdoblamiento del segundo tono cardíaco, demostraban junto con apreciable hépatomegalia la participación miocárdica típica en la enfermedad.

En 1927 establecimos en firme, aunque sin demostración micrográfica, diagnóstico clínico de enfermedad de CHAGAS en niña de 5 años de Ingenio Ledesma (provincia Jujuy) febril, con edema de un lado de la cara más manifiesto en párpados homólogos, aceleración de pulso, agrandamiento de hígado y bazo en ausencia de lesión renal, plasmodios malarígenos, microfilarias u otros parásitos en la sangre, la cual ostentaba altísima linfocitosis.

La fotografía de esta paciente nos sirvió luego en diapositivo, para conferencias profesadas en el interior del país, para cursos complementarios en la Cátedra de Microbiologia de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, cursos y conferencias que pretendían incitar a los médicos y estudiantes a reconocer la enfermedad de CHAGAS, sobre todo en los sitios donde abundaban triatomíneos infestados de *Schizotrypanum cruzi.*

Para 1929 nos fué dado encontrar en Jujuy armadillos (*Chaetophractus vellerosus vellerosus*) con infección natural por el agente de la enfermedad.

También comprobamos en 1930 en los órganos de estos animales, de los más primitivos, así como propios de América, especiales elementos policariocíticos repletos de formas tesiduales de *Schizotrypanum cruzi* muy apropiadamente designados *Gigantocitos quísticos* por MAGARINOS TORRES y PENNA DE AZEVEDO.

Otra especie de armadillo encontramos en 1931 en el Norte santafesino, *Dasypus novemcinctus* con infección natural por *S. cruzi* y las mismas lesiones mencionadas para *Chaetophractus vellerosus vellerosus* de Jujuy.

En el año 1931 también demostramos en el Norte santafesino infección natural por *S. cruzi* de dos especies de "comadrejas" (marsupiales), común en todo el país una de ellas, la "picaza" u "overa" *Didelphis azarae* (paraguayense) y menos frecuente la otra "colorada" (*Lutreolina crassicaudata paranalis*).

El aspecto de las células que albergaban formas de reproducción del parásito en tejido de estos marsupiales, principalmente el muscular, diferían un tanto del establecido para iguales elementos de los edentados.

En 1932, previo diagnóstico clínico, establecido de acuerdo con los cuadros sintomatológicos descriptos en el país por nosotros, calcado sobre las exposiciones clásicas de CARLOS CHAGAS, la M. E. P. R. A. demostró por microscopía positivo de sangre caso agudo de enfermedad de CHAGAS en niño de 8 años de edad en el Norte santafesino con predominantes fenómenos febriles y de edema palpebral por inoculación cutánea en ángulo externo de los párpados izquierdos. — En 1933, en niña de 2½ años habitante del Chaco, con manifestaciones de edemas fugaces de cara y párpados y luego anasarca con fiebre, poliadenopatías, hépatoesplenomegalia y taquicardia, la M.E. P.R.A. practicó iguales comprobaciones de parasitismo hemático por *S. cruzi*.

Sangre de esta enferma inoculada peritonealmente en perrito de un mes de edad, determinó muerte del animal en 18 días y, aparte de otras lesiones, se observaron en hígado *"nódulos de histiocitosis"* de gran valor para diagnóstico de enfermedad de CHAGAS en hombres y animales por necropsia o simple viscerotomía hepática.

Para fines de 1933 fué dado a la M.E.P.R.A. reconocer en territorio de la provincia Santa Fé una enferma de esquizotripanosis de 1 año de edad, que falleció en poco tiempo, y cuya necropsia, la primera de forma aguda de enfermedad de CHAGAS realizada en el país, permitio reconocer en miocardio

histiocitos con parásitos y "Gigantocitos quísticos" o "policariocitos" sin parásitos, como elementos residuales de intensa *"miocarditis chagásica"*.

En igual año (1933) reconocíamos en provincia Salta soldado conscripto con infección por *Schizotrypanum cruzi* demostrables durante un año en la sangre. Los fenómenos de edema palpebral matinales en este paciente eran muy conspicuos, al punto de resultar irreconocible el enfermo cuando recién despertaba.

En 1934 denunciamos en Jujuy infecciones esquizotripanósicas naturales en gatos jóvenes (*Felis domesticus*), casi siempre en viviendas que también albergaban niños con enfermedad de CHAGAS. Al mismo tiempo dimos a conocer en igual año enfermos agudos de este padecimiento en las provincias Jujuy, Santiago del Estero y Catamarca.

La M.E.P.R.A. había de tal modo reunido para 1934 apreciable número de enfermos debidamente comprobados por examen positivo de sangre. Solamente los presentados en la Novena Reunión de la Sociedad Argentina de Patologia Regional, en Mendoza, en Octubre de 1935, ascendieron a 35 enfermos.

La exposición de estos casos, así como la de numerosos hechos novedosos relacionados con la esquizotripanosis, ocupó todo un volumen de 365 páginas, el primero de los tres en que se publicaron las actas de esta Reunión.

Ela se organizó en homenaje a CARLOS CHAGAS fallecido el año anterior y cuya obra enaltecimos así con orgullo de sudamericanos, destacando el considerable valor continental de su descubrimiento y el ineludible deber de todos los países del nuevo mundo, de propender a la investigación de la enfermedad de CHAGAS en sus propios territorios con ánimo decidido de contribuir para el mejoramiento sanitario de esas regiones.

Desde dicha Reunión de 1935, de la Sociedad Argentina de Patología Regional, quedaron incorporadas a los primitivos territorios conocidos como albergadores de pacientes con enfermedad de CHAGAS, las provincias San Juan, Córdoba, La Rioja y Entre Ríos.

Se multiplicaron luego los hallazgos en sitios ya conocidos como endémicos y nuevas regiones se agregaron, tales como Corrientes, y se llegó para 1936 hasta Neuquén, en cuya Capital en los 39° de latitud Sur comprobamos enfermos que son los más australes del continente y demostraron con su presencia allí, lo inadecuado de la denominación de enfermedad tropical y más aún de tripanosomiasis brasileña que todavía entonces algunos aplicaban al padecimiento.

La expansión del huésped intermediario de la enfermedad de CHAGAS meridionalmente, alcanza sin embargo a los 46º de latitud Sur con una especie *Triatoma patagonica,* que en Mendoza demostramos infestada en un ejemplar por *S. cruzi* en cuevas de cuyes (*Microcavia australis*).

Triatomíneos infestados de la especie común en Argentina (*Triatoma infestans*) se han hallado hasta los 41º de latitud Sur (San Antonio Oeste en Gobernación Río Negro y Carmen de Patagones en Provincia Buenos Aires).

No ha sido, pues, rebasado hasta ahora el paralelo 39 Sur, en cuyo nivel se concentró desde la Cordillera de Los Andes en el oeste hasta Bahía Blanca, en el Este, sobre el Atlántico, el límite más inferior de casos humanos de enfermedad de CHAGAS. [(Neuquén, Fuerte General Roca y Cipoletti (Río Negro)] y animales domésticos naturalmente infectados por *S. cruzi* (Fuerte General ROCA (Rio Negro) y Bahía Blanca (provincia Buenos Aires).

La comprobación en Neuquén de 2 muertos (en 6 enfermos) de ocho y nueve años de edad, con hallazgo en necropsia de uno de ellos de intensas lesiones miocárdicas y formas tesiduales de *S. cruzi,* demuestra que, aún pertenciendo a regiones frías, el parásito conserva su virulencia y capacidad patogénica de producir una de las más típicas lesiones de esta enfermedad (miocarditis chagásica).

Quedó evidenciada también a esta altura de las investigaciones de la M.E.P.R.A. la gran difusión y variedad de especies animales que en el país albergaban el *S. cruzi* en la sangre, constituído en verdaderos depósitos vertebrados (mamíferos únicamente) del virus de la enfermedade de CHAGAS.

Además de los animales domésticos como gato y perro (*Felis domesticus* y *Canis familiaris*) hallados infectados en todas las provincias y Gobernaciones de la Nación exceptuando Misiones, La Pampa y territorios propiamente patagónicos (por falta de investigación) se encontraron las especies portadoras de *S. cruzi* que expresa la lista que se acompaña, todas determinadas exclusivamente por la M.E.P.R.A. y gran parte de ellas ya publicadas.

LISTA DE MAMÍFEROS ARGENTINOS HALLADOS CON INFECCIÓN NATURAL POR "S. CRUZI" POR LA M E. P. R. A.

EDENTADOS :

Chaetophractus vellerosus vellerosus.
Chaetophractus vellerosus pannosus.
Chaetophractus villosus.

Zaedyus pichyi caurinus.
Tolypeutes matacos.
Dasypus novemcinctus.
Cabassous unicinctus.

MARSUPIALES:

Didelphis azarae.
Lutreolina crassicaudata paranalis.
Marmosa pallidior.

MUSTELIDOS:

Grisonella ratellina.
Grisonella huronax.
Tayra barbara.

CÁNIDOS:

Cerdocyon thous.
Pseudoplex gracilis gracilis.
Pseudoplex culpeus culpeus.
Pseudoplex culpeus andinus.

SCIURIDOS:

Leptosciurus argentinus.

QUIROPTEROS:

Histiotus laephotis.
Histiotus montanus.
Myotis dinellii.
Myotis nigrican nigricans.
Tadarida macrotis.

Desde el límite austral ya indicado, la presencia de triatomíneos domiciliarios en las viviendas rurales, sobre todo de adobes o de paredes de barro, es casi constante sin soluciones de continuidad hasta los países vecinos de la República por el Norte.

Damos a continuación en forma somera indicadas las especies de mayor frecuencia en el país :

LISTA DE TRIATOMÍNEOS ARGENTINOS DOMICILIARIOS Y DE NIDOS DE AVES O CUEVAS DE MAMÍFEROS DETERMINADOS POR LA M.E.P.R.A. (*)

Triatoma Bruchi.
+ *Triatoma infestans.*
Triatoma Mazzae.
+ *Triatoma Oswaldoi.*
+ *Triatoma patagonica.*
+ *Triatoma platensis.*
+ *Triatoma Rosenbuschi.*
+ *Triatoma rubrovaria.*
+ *Triatoma sordida.*
+ *Panstrongylus geniculatus.*
+ *Panstrongylus seai.*
Eratyrus eratyrusiforme.
Psammolestes coreodes.

Aunque el número de especies argentinas de triatomíneos es mayor que el que se indica en lista especial, las consignadas son las halladas por la M.E. P. R. A. en sus exploraciones sobre todo domiciliarias en todo el país. Aun cuando *T. infestans* es sensiblemente la especie más abundante y frecuente en todo el territorio, con gran adaptación a la vivienda humana, todavía se la encuentra también en nidos de pájaros y albergues de comadrejas en ciertas regiones.

T. platensis es sobre todo habitante de nidos de pájaros, así como *Psammolestes coreodes.*

Triatoma patagonica, en cambio, ha sido hallada preferentemente en cuevas de *Miocrocavia australis*.

(*) La Cruz de la izquierda marca las especies que se establecieron infestadas naturalmente con *Schizotrypanum cruzi*.

EDADES DE 1232 CASOS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS RECONOCIDOS EN ARGENTINA EXCLUSIVAMENTE POR LA M.E.P.R.A. HASTA EL 30-VI-46

Hasta 6 meses	85	6.89%
De 6 meses a 1 año	85	6.89%
De 1 a 2 años	133	10.79%
De 2 a 5 años	249	20.21%
De 5 a 10 años	265	21.50%
De 10 a 20 años	248	20.12%
De 20 a 40 años	131	10.63%
De 40 a 60 años	31	2.51%
Más de 60 años	5	0.40%
	1.232	

MANIFESTACIONES CLÍNICAS POR LAS CUALES FUERON PRESUMIDOS CHAGÁSICOS 1244 ENFERMOS LUEGOS COMPROBADOS POR LA M.E.P.R.A.

Oftalmoganglionar	769	61.65%
Chagomas de inoculación	280	22.50%
Anasarca	73	5.86%
Síntomas infecciosos generales	27	2.17%
Chagomas hematógenos	16	1.28%
Esquizotripanides	14	1.12%
Hépatomegalia	6	0.48%
Meningoencefalitis (convulsiones)	6	0.48%
Edema de cara (abotagamiento)	15	1.20%
Diarrea y fiebre	9	0.72%
Llanto, inquietud y fiebre	9	0.72%
Lipochagoma geniano	4	0.32%
Fiebre solamente	3	0.24%
Exoftalmia (sin edema de párpados)	3	0.24%
Infartos ganglionares (macriadenapatías)	3	0(24%
Edemas irregulares (edema duro de pies o piernas)	2	0.16%
Marasmo (distrofia o desnutrición)	2	0.16%
Miocarditis grave aguda	2	0,16%
Extrasistolia	1	0.08%
	1.244	

CASOS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS DEMOSTRADOS POR LA M. E. P. R. A. EXCLUSIVAMENTE, HASTA EL 30 DE JUNIO DE 1946.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	TOTALES
Jujuy..........	6	2	1	1	3	5	2	1	2	2	2	2	29
Salta..........	3	3	3	2	3	2	3	—	1	3	4	2	29
Tucumán.......	1	1	—	—	4	1	1	—	1	3	4	3	19
Sgo. del Estero..	9	4	4	12	5	7	4	4	6	9	13	6	83
Córdoba........	2	2	—	5	3	2	—	1	1	2	4	3	25
San Luiś......	1	—	—	1	1	1	—	—	—	1	1	—	6
Catamarca.....	1	5	3	8	4	3	—	—	8	4	5	2	43
La Rioja.......	2	—	—	5	3	6	2	1	6	11	9	3	48
San Juan......	4	6	7	8	4	2	—	4	2	7	8	7	60
Mendoza.......	51	39	48	35	16	2	—	1	—	24	53	53	322
Neuquén.......	3	1	—	—	2	—	—	—	—	—	1	—	7
Rio Negro......	—	—	1	1	3	—	—	—	—	—	1	—	6
Formosa.......	4	1	1	—	—	2	—	—	—	2	2	3	15
Chaco..........	17	30	48	41	31	29	17	14	26	22	30	36	311
Corrientes......	—	1	1	—	2	—	—	1	—	1	3	1	10
Entre Rios.....	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	3
Santa Fé.......	19	16	23	27	15	22	8	11	11	14	13	19	198
	124	111	140	146	99	85	38	38	64	105	154	140	1.244

Del total, 1305, hay 61 sin determinación del lugar de infección ni fecha de ésta, ni otros datos generales.

MÉTODOS CON QUE FUERON DIAGNOSTICADOS POR LA M.E.P.R.A. 1244 CASOS DE ENFERMEDADE DE CHAGAS DE PRIMOINFECCIÓN HASTA EL 30-VI-46

Microscopía	1.033	83.00%
Inoculación	59	4.74%
Reacción de Guerreiro-Machado	36	2.87%
Fórmula leucocitaria y evolución	5	0.40%
Xenodiagnóstico	51	4.09%
Biopsia de chagoma de inoculación	19	1.52%
Biopsia de ganglio linfático	32	2.66%
Biopsia de conjuntiva	8	0.64%
Autopsia	1	0.08%
	1.244	

EDADES DE 33 MUERTOS, SOBRE 1.232 PACIENTES DE PRIMER PERÍODO DE ENFERMEDADE DE CHAGAS COMPROBADOS POR LA M.E.P.R.A. HASTA EL 30 DE JUNIO DE 1946

Menos de 1 mes (26 dias)	1
Hasta 3 meses	12
De 3 a 6 meses (16 sobre 85 = 18, 50 %)	3
De 6 meses a 1 año	6
De 1½ a 2 años (28 sobre = 14, 9 %)	4
De 2 a 2½ años	1
De 8 años	2
De 9 años	1
De 12 años	1
	33

(33 sobre 1.232 = 2,67 %)

Tal expansión, en el territorio argentino, de agentes transmisores infestados y depósitos de virus de la enfermedad de CHAGAS, indicaba desde luego que ésta existia seguramente difundida en toda la República.

En efecto, con la sola excepción de la provincia Buenos Aires, las 13 restantes hemos demostrado que albergan enfermos chagásicos. De las nueve Gobernaciones, únicamente en Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego, no se han denunciado pacientes; en la gobernación Misiones varios casos hemos examinado, de indudable naturaleza esquizotripanósica, pero que no pudieron demostrarse etiológicamente: uno sin embargo, tuvo examen histo-patológico de ganglio linfático y músculo con todos los caracteres que hemos señalado como típicos de la enfermedad de CHAGAS. Por otra parte, los triatomíneos de ese territorio nacional se destacan por intensas infestaciones por *S. cruzi*.

El quadro de distribución geográfica de enfermos en Argentina que reproducimos a continuación, resume únicamente los hallazgos de la M.E.P.R.A., por cuanto, aparte de la seguridad que nos asiste de la debida comprobación, representan un esfuerzo generoso de un grupo calificado de médicos del país que con su cooperación han permitido reunir, con uniformidad de criterio, todas estas informaciones.

La Pampa ha sido también demostrada con enfermos por otros investigadores del país; de algunos tuvimos oportunidad de seguir el curso de las

comprobaciones y por ello incluímos su territorio entre los afectados por el flagelo.

Los números que se indican están muy lejos de representar la existencia real de enfermos: en muchos lugares fué sólo episódica la investigación por la presencia allí temporaria de médicos conocedores de la infección y de actividad capaz de favorecer las necesarias observaciones. Apenas las circunstancias alejaron estos colegas del sitio, otros que acudieron no continuaron el esfuerzo.

Aun parcial, pues, este cuadro, trazado sin funcionarios obligados a la búsqueda y sin la contribución de la denuncia obligatoria de la enfermedad, muestra la considerable participación que la enfermedad de CHAGAS debe tener en la morbilidad general del país y en especial en sua mortalidad infantil.

En efecto, de 33 muertes que se han registrado, 28 corresponden a niños de primeira infancia; de los restantes, uno tenía 2½ años, 2 llegaban a 8, 1 a 9 y otro a 12 años. La mortalidad, pues, que parece reducida cuando se la relaciona con el total de enfermos comprobados, es elevada si se considera que de los 28 fallecidos de primeira infancia, 16 sólo alcanzaban a *seis meses de edad* (57 %) y representam el 14 % de los estudiados de esa edad.

Nos referimos em nuestras comprobaciones y en esta exposición sólo a formas primarias o de primer período de la enfermedad. No es nuestro propósito estudiar lo adquirido respecto a las formas de segundo y tercer período con su más frecuente resultado la cardiopatía o carditis chagásica, entidad compleja y de todos modos no bien definida clínicamente aún, y cuyo análisis sería en extremo complejo. — No hay duda que, en determinados casos, reviste particular gravedad la carditis chagásica genuina, pero realmente son muchas las confusiones que reinan sobre su naturaleza y la forma de comprobarla con seguridade.

Es evidente que no basta para calificarla la obtención de tal o cual reacción serológica positiva, dependiente muchas veces del grado de la proteidemia existente y sin carácter específico alguno, del cual, por otra parte, carecen las desviaciones del complemento en general, y se debe exigir en todos los casos la comprobación etiológica adecuada. Siven, pues, sólo como motivo de presunción muy serio las reacciones positivas, para inducir a la ejecución de otros actos decisivos de comprobación, entre los que damos definida preferencia a la inoculación en animales de experiencia.

Cabe destacar que, desde que introdujimos en 1936 el tratamiento de la enfermedad de CHAGAS por 7602 (Ac) Bayer, la mortalidad de los niños de

primera infancia y sobre todo lactantes afectados, disminuyó francamente. En efecto, fué nuestra impresión que de no haber mediado esta específica terapéutica (*acetato de dialilmalonil diamida de la 2 metil, 4-6 diamino quinoleina*) hubiesen resultado fatales varios casos de formas meningoencefálicas ya primitivas ya secundarias que hubo oportunidad de tratar debidamente. Dicha sal que ha sido últimamente preparada en Inglaterra con la designación de 3024 M. revelándose al mismo tiempo su fórmula, es de aplicación intramuscular al 3% y determina, aun en dosis reducida, manifiesto y rápido retroceso de la sintomatologia de la enfermedad de CHAGAS, aunque la esterilización del organismo no tiene lugar. La acción sin embargo sobre los *S. cruzi* en circulación es sensible, y hace desaparecer a éstos en escaso tiempo de la sangre.

Apesar de la mezcla del producto con dos veces su peso de urea para favorecer la solubilidad y disminuir el dolor, éste casi siempre se produce en mayor o menor grado y hace que los enfermos, niños sobre todo y mujeres pusilánimes rehuyan algunas veces la prosecución hasta su totalidad del tratamiento necesario que, la experiencia nos ha mostrado, ser como *minimun*, de sesenta miligramos por kilo para adultos y niños de segunda y tercera infancia, y de 150 miligramos por kilo para niños de primera infancia y todavia mayor para lactantes de edad inferior a 6 meses, en especial si están afectados por formas meningoencefálicas.

La penicilina en aplicaciones intramusculares cada tres horas se ha mostrado de útil y brillante acción clinica en ciertos casos, en contraste con otros de completa inocuidad.

Naturalmente que todo el material que hemos expresado permitió a la M.E.P.R.A., sobre todo donde pudo obtenerse la hospitalización de los enfermos, numerosas observaciones de interés que realzaron el valor que ya en si mismo tiene la enfermedad de CHAGAS como uno de los más apasionantes capítulos de patologia que hayan sido revelados en medicina.

Así es como con su atento estudio, además de los ensayos de tratamientos diversos hasta dar con el 7602 (Ac) Bayer y ahora el 3024 M.I.C.I. que consideramos clinicamente específico, se reconocieron numerosas particularidades de este padecimiento americano, como: Producción en el dia de dos o más elevaciones térmicas, como en las leishmaniosis viscerales.

Dacrioadenitis chagásicas como excelente síntoma de infección aun transcurrida, unilateral o bilateral, y de todos modos expressión de lesión de origen hematógeno en las formas oftalmoganglionares.

La preexistencia común de fenómenos generales, toxiinfecciosos, en los cuadros oftalmoganglionares. — La producción de éstos consecutivamente a traumatismo en región orbitaria.

La frecuencia casi dominante de lesiones cutáneas de entrada de la infección (*chagomas de inoculación*) aun en casos de aparente forma oftalmoganglionar de supuesta contaminación conjuntival.

La naturaleza de *pandermitis erosivo ulcerosas* y de *citoesteatonecrosis* hipodérmica con abundantes *leishmanias* de *S. cruzi* quedó establecida para los *chagomas* mediante el estudio histológico de numerosas biopsias de tales lesiones.

La existencia de *chagomas hematógenos* ubicuos y su estructura histológica se estudió, así como la de los *chagomas metastásicos* y *lipochagomas genianos*.

Los chagomas metastásicos aparecen en torno del chagoma de inoculación o de puerta de entrada como si existiese proceso multicéntrico de manifestaciones cutáneas tumoroides. — Histológicamente son dermitis con citoesteatonecrosis inflamatoria del tejido celular subcutáneo y linfangitis troncular.

Se demonstraron manifestaciones cutáneas eruptivas morbiliformes, urticariformes, eritematosas polimorfas y ulcerosas en cualquiera de los períodos de la enfermedad de CHAGAS.

De éstos se establecieron tres en lugar de la división de la enfermedad en aguda y crónica simplemente, pues en la primera muchas veces son revelables parásitos en la circulación por 7 y hasta 9 meses, saliendo del cuadro clínico aceptado de duración de los estados agudos.

Se evidenciaron lesiones chagásicas en vasos arteriales y venosos (endoflebitis y endoarteritis), además de lesiones endocárdicas y pericárdicas.

Reconocimiento de aspecto tuberculoide de algunas lesiones elementales de la enfermedad de CHAGAS y demostración de ser nódulos histiocitarios: reproducción de los mismos por lisado-filtrado-dialisado de *S. cruzi*.

Con la aplicación de estos lisados-filtrados-dialisados se estudió en enfermos de esquizotripanosis, la alergia cutánea.

Se confirmó en necropsias humanas la neuraxitis mortal chagásica.

Fué reconocido un tipo especial de miocarditis crónica chagásica (tipo FIEDLER, SCHMORL y SELLENTIN).

Se estudiaron en forma sistemática las adenopatías humanas en la enfermedad de CHAGAS, ya en su aspecto constelar topográfico, ya en sus características histológicas, de modo que no cuentan con precedentes en estudios ajenos, lo mismo que gran parte de los otros hallazgos mencionados.

Se practicaron diagnósticos de enfermedad de CHAGAS algunas veces por sólo el examen biópsico de ganglios linfáticos.

Por último se estableció la naturaleza de las lesiones conjuntivales en enfermedad de CHAGAS y algunos casos de ésta fueron demonstrados exclusivamente por hallazgos parasitarios en esa membrana ocular.

Contribuyeron para todas estas adquisiciones por veces en grado decisivo y siempre generoso, los Doctores JÖRG, M.E., BASSO GERMINAL, BASSO REDENTO, MIYARA S., FREIRE R.S., ZAMBRA E.R., PARMA B., BENÍTEZ CLEMENTE, ARGAÑARÁS C.A., URCELAY G. y muchos otros en forma ya más esporádica.

A todos ellos se debe la paulatina y progresiva elevación de este gran edificio científico que forma el estudio de la enfermedad de CHAGAS, que todas las naciones de nuestro continente están en el deber de afianzar y ensanchar, aún aquellas como Estados Unidos por ahora sólo aparentemente libres de la invasión humana del flagelo.

Es este carácter americano el que infunde su mayor importancia al descubrimiento de CARLOS CHAGAS y será el mejor homenaje a la preclara personalidad de éste contribuir por todos los medios a dilucidación de los problemas que crea la enfermedad en los ambientes rurales de este hemisferio.

SUMARIO

La enfermedad de CHAGAS fué conocida en Argentina desde 1911 por conferencias y demonstraciones efectuadas por LOZANO, MAGGIO y ROSENBUSCH. En 1914 MAGGIO y ROSENBUSCH hicieron las primeiras comprobaciones de infestación por *S. cruzi* de *Triatoma infestans*, triatomíneo más común del país y en la mayor parte de su territorio. Em 1924 MÜHLENS y colaboradores hallaron los primeros seres humanos con infección por *S. cruzi* al practicar exámenes de sangre buscando parásitos malarígenos. En 1926 MAZZA encontró al perro con infección natural por *S. cruzi;* el mismo autor en 1927 diagnosticó clínicamente, aunque sin comprobación micrográfica, el primer caso agudo conocido del país, con la sintomatología descripta por CHAGAS. En 1932 se comprobaron por microscopía positiva de sangre los primeros enfermos previamente presumidos chagásicos por el aspecto clínico divulgado

por MAZZA en Argentina. Estos sumaron luego hasta ahora 1.305 etiológicamente comprobados por la M.E.P.R.A., conociéndose para 1.244 de ellos la procedencia por provincias: 341 (la mayor cifra) del Chaco; 322 de provincia Mendoza; 198 de provincia Santa Fé, etc.

De las 33 muertes establecidas sobre um total de 1.232 enfermos de edades conocidas, 28 son de primeira infancia y de ellos, 16 sólo alcanzaban a 6 meses de edad (57 %) y representan 14% de los afectados de esa edad (85, o sea 6,89 % del total). La mayor frecuencia de afectados se comprobó en niños de 5 a 10 años con el 21,5% del total, siguiédole los grupos de 2 a 5 años con 20,21% y de 10 a 20 años con 20,12%.

Esta placa foi entregue em Buenos Aires pelo Delegado do Instituto Oswaldo Cruz. Prof. Dr. Carlos Magarinos Torres, em cerimônia presidida pelo Ministro da Educação e, segundo decidiu a Exma. Viuva de Mazza, seria afixada no túmulo do homenageado.

O Pofessor SALVADOR MAZZA entregando ao Professor HENRIQUE ARAGÃO, diretor do Instituto Oswaldo Cruz, em Manguinhos, a placa em homenagem à memória de GASPAR VIANNA. Sessão Especial do Congresso Panamericano de Medicina, dedicada à Doença de Chagas, realizada no I.O.C. aos 11 de Setembro de 1946.

Dizeres da placa :

La Sociedad Argentina de Patologia Regional
Al Genial Investigador GASPAR VIANNA.
1.° Congresso Interamericano de Medicina.
Rio de Janeiro, 7 — 15 setiembre 1946.

Esta placa acha-se colocada na sala principal da Divisão de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, à qual GASPAR VIANNA deu o melhor da sua sabedoria e atividade.

Comentários

Análise Clínico-epidemiológica da Doença de Chagas de 1911 a 1942 na Argentina

Rodrigo Correa-Oliveira
Laboratório de Imunologia Celular Molecular
Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz

Nessa preciosa revisão sobre o processo de identificação, descrição de casos e epidemiologia da doença de Chagas na Argentina, o professor Salvador Mazza apresenta a descrição de uma série de eventos que culminaram na demonstração da grandiosidade do problema de saúde que a doença de Chagas representava para a Argentina à época.

O artigo inicia-se com informação sobre o enorme impacto que a descoberta de Carlos Chagas teve no conhecimento da epidemiologia da doença na Argentina. Mazza diz claramente que, quase em seguida ao descobrimento da tripanossomíase americana realizada por Carlos Chagas no Brasil, foi reconhecida a existência da doença de Chagas na Argentina. Mostra ainda que, em conferência da Sociedade Argentina de Higiene Pública e Engenharia Sanitária, o material enviado pela Fundação Oswaldo Cruz foi muito importante para que os médicos locais tomassem conhecimento sobre as características da doença.

Essa revisão apresenta uma descrição do intenso processo de investigação desde a descoberta da doença de Chagas, compreendendo estudos de 1911 até 1949, analisando detalhadamente casos de pacientes identificados durante esse período, e culmina com a descrição de lista de mamíferos hospedeiros naturais, lista de triatomíneos domiciliados encontrados na Argentina, inclusive mostrando a relação próxima com os ninhos de aves. Chamam a atenção a complexidade e a extensão do estudo, que levantou, em praticamente toda a República Argentina, os casos suspeitos e posteriormente confirmados, assim como todos os hospedeiros intermediários e mamíferos portadores de infecção. No artigo, Mazza mostra ainda que os dados achados foram fundamentais para a avaliação epidemiológica da doença, que posteriormente revelou-se de dimensão continental.

Além de haver apresentado os estudos epidemiológicos extremamente bem conduzidos, o artigo foi significativo em sua contribuição clínica e descrição e confirmação dos casos. A riqueza dos dados nele expostos contribuiu, sem dúvida, e ainda contribui para

o entendimento da patologia chagásica. A revisão inclui cinco quadros em que o autor descreve a prevalência dos casos de doença de Chagas por faixa etária, mostrando que nos 1.232 casos analisados a transmissão ativa ocorria, em sua maioria, até os 20 anos de idade. No texto, também fica claro que havia grande número de casos agudos com conseqüências graves, como registrado no segundo quadro de manifestações clínicas, o qual apresenta também uma lista de sintomas característicos da fase aguda da doença de Chagas.

No artigo, Mazza afirma que somente a reação sorológica não era suficiente para diagnosticar a doença. Essa observação é interessante porque, ainda hoje, temos grandes dúvidas quanto à utilização da sorologia no diagnóstico da doença de Chagas. Sabemos que o único método que permite o diagnóstico claro é a identificação do parasito. No entanto, com avanços tecnológicos estamos nos aproximando cada vez mais de um método sorológico e/ou molecular para o diagnóstico da doença de Chagas.

Essa discussão torna-se ainda mais relevante quando consideramos a importância do tratamento. Em sua revisão, Mazza relata de maneira clara e objetiva os vários ensaios feitos pelo grupo da Misión de Estúdios de Patologia Regional Argentina (Mepra) da Universidade de Buenos Aires com as drogas disponíveis à época, quando eram tratados casos de crianças, adultos e gestantes, demonstrando que as drogas eram capazes de diminuir significativamente a parasitemia. A opinião do autor é que esse tratamento foi de grande importância para esses indivíduos que apresentavam parasitemia elevada e que a droga (7602 (Ac) Bayer) foi eficaz. O grupo testou ainda outro componente, 3024 M, que se mostrou eficaz na diminuição dos sintomas e que, apesar de reduzir o número de parasitas circulantes, não foi capaz de eliminá-los.

Nesse artigo, Mazza apresenta um impressionante número de informações e observações que permitiu a elaboração de quadros que descrevem de modo claro a doença de Chagas com toda a sua riqueza de sintomas, a eficácia de drogas, assim como incentivou e mostrou a necessidade da investigação contínua sobre essa endemia que até os dias de hoje afeta a população de grande parte das Américas.

Salvador Mazza: considerado o redescobridor da doença de Chagas pelos argentinos

Sylvio Celso Gonçalves da Costa
Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Salvador Mazza é considerado pelos pesquisadores argentinos como o redescobridor da doença de Chagas (Iglesias, 1990). Boa parte de sua formação se fez no Instituto Pasteur de Tunísia, sob forte influência do grande pesquisador francês Charles Juillet Nicolle, um grande aliado na progressão de sua carreira. Além da metodologia científica, Mazza era um

conhecedor dos aspectos filosóficos que acompanham a vida do pesquisador (Nicolle, 1993). Uma fase de seu aperfeiçoamento iniciou-se no Instituto Pasteur de Paris, no laboratório de parasitologia de Émile Brumpt, que desempenhou importante papel no estudo da evolução do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* no barbeiro, contribuindo assim para o conhecimento correto da transmissão do parasito pelas fezes do vetor (Brumpt, 1912a, 1912b, 1913). Esse tema foi revisado por Carlos Chagas mais tarde (Chagas, 1921, 1927).

A carreira de Mazza envolveu estudos sobre diferentes endemias que ocorriam na região Norte da Argentina no início do século passado. As investigações realizadas nas regiões Norte e Noroeste do país requeriam apoio governamental e, conseqüentemente, um investimento financeiro muito alto para um trabalho contínuo em uma área extensa e pobre do país. Com a chegada de Nicolle à Argentina, o governo entendeu que todos os esforços seriam compensados com um levantamento criterioso da saúde pública naquele país.

Uma das primeiras contribuições desse pesquisador foram as investigações que mostraram que o *Triatoma infestans*, o triatomíneo então mais difundido na Argentina, se apresentava naturalmente infectado pelo *T. (S.) cruzi*. Nessa fase, Mazza realizou vários trabalhos experimentais, infectando animais que apresentaram, no curso da infecção, lesões características da doença de Chagas descritas por Gaspar Vianna (1911).

O impressionante é que, apesar das investigações que mostraram que o vetor *Triatoma infestans* ocorria em grande parte do território argentino, somente em 1924 foi detectado que o *T. (S.) cruzi* infectava o homem naquele país (Mühlens & Petrochi, 1925). As investigações sobre a incidência da malária na região Norte da Argentina permitiram detectar uma criança em Tucuman e outra em Jujuy infectadas pelo *T. (S.) cruzi*. A província de Jujuy começou a receber mais atenção e, algum tempo depois, Mazza encontrou um cão, considerado como reservatório doméstico importante, infectado naturalmente. Esses estudos progrediram, investigando a patologia de animais naturalmente infectados, e foram publicados posteriormente (Mazza & Jörg, 1940). O trabalho de Mazza dava início a uma fase de fundamental importância para que a doença de Chagas fosse reconhecida como patologia importante, e não como doença exótica, como era considerada por alguns médicos brasileiros na época. Esses resultados por si sós mostraram que Carlos Chagas estava correto ao afirmar que a nova patologia humana por ele descoberta era de importância para todo o continente.

Na década de 30, Salvador Mazza tomou a iniciativa de promover a formação dos médicos do interior do país por meio de cursos e conferências para que entendessem que uma nova patologia deveria estar ocorrendo no interior da Argentina, o que permitiu uma mudança radical. Chamou a atenção para as lesões de porta de entrada, tanto para o chagoma que caracterizava lesões cutâneas anteriormente relegadas a um segundo plano como para as lesões oculares com edema unilateral. Na época, Mazza realizava um trabalho extenso, investigando os reservatórios silvestres das regiões de Jujuy e Salta, além de áreas periféricas. Surgiu, assim, um instituto de pesquisa para doenças endêmicas da região, onde os animais foram empalhados e ficaram guardados como documentação de toda investigação por ele realizada.

Na Argentina, verificou-se incidência elevada da infecção pelo *T. (S.) cruzi* em crianças com idade até 5 anos, com mortalidade elevada e uma patologia grave. Carlos Chagas também relatou casos graves em crianças, porém em número pequeno em relação aos descritos por Mazza. Deve-se enfatizar, entretanto, que as crianças na região Norte da Argentina tinham bonecas em que algumas partes eram ocas, o que permitia a entrada dos barbeiros em suas diferentes fases evolutivas; tais bonecas ficavam muito tempo com as crianças, inclusive quando estavam de cama, doentes, o que muito favoreceu a elevada incidência das infecções

pelo *T. (S.) cruzi*. O diagnóstico realizado por Mazza em pacientes com suspeita de estarem infectados pelo *T. (S) cruzi* teve uma fase de grande progresso quando ele desenhou uma caixa com telas para realizar xenodiagnóstico e o dr. Miyara começou a fabricá-la em Mendoza. Essas caixas, com a aparência de um relógio, foram distribuídas entre os colaboradores da Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (Mepra), o que facilitou muito o diagnóstico.

Nesse artigo publicado em 1949 nas *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, o autor chama a atenção para o fato de que na reunião da Mepra que ocorreu em 1934 foram relatados os casos de doença de Chagas encontrados até aquele momento, que chegaram a 35 em 1935. As reuniões da Mepra realizaram-se regulamente e foram fundamentais para o desenvolvimento das pesquisas sobre o que seus membros denominavam "enfermidades regionais" (enquanto no Brasil predominou o termo "medicina tropical"). Tais reuniões, entretanto, se expandiram de tal forma que se tornaram fundamentais para o conhecimento da parasitologia geral do nosso continente. Realizaram-se em diferentes províncias da região Norte do país, como Salta, Jujuy, Córdoba, Mendoza etc.

Tendo conhecimento das investigações de Carlos Chagas sobre reservatórios silvestres e domésticos, como cão e gato, Mazza iniciou uma ampla averiguação na região Norte da Argentina, sempre comunicando seus achados, assim como os de outros pesquisadores, nas reuniões da Mepra, o que induziu os estudos de outros colegas em diversas províncias dessa região. Assim, realizou-se uma ampla avaliação de reservatórios infectados pelo *T. (S.) cruzi* e também de diferentes espécies de vetores, conforme relatado no artigo aqui comentado, confirmando grande parte dos resultados de Carlos Chagas (1912). Os reservatórios encontrados parasitados tiveram alguns exemplares empalhados e preservados na casa que tive oportunidade de ver, e que se encontrava abandonada na época em que visitei a região, em 1992. O controle epidemiológico era feito regularmente, e as casas eram borrifadas pelos agentes de saúde, que após o trabalho escreviam nas madeiras existentes CM (significa Chagas/Mazza, como a doença é chamada em muitas regiões) e a data.

Todos esses assuntos eram também amplamente discutidos em reuniões da Sociedad Argentina de Patología Regional del Norte (SAPRN), entidade considerada *sui generis* e que, concebida e instalada para funcionar com uma logística bem estruturada, permitiu a discussão dos problemas de saúde pública da região Norte daquele país. A primeira seção dessa sociedade foi criada em San Salvador de Jujuy em 23 de fevereiro de 1926; a segunda, na cidade de Salta, em 24 de fevereiro de 1926, e a terceira em San Miguel de Tucumán, em 28 de março de 1926. E assim foram se espalhando por outras províncias como Catamarca, Santiago del Estero, La Rioja etc.

Por intermédio de Mazza, a Mepra fez um projeto de construção de um vagão-laboratório e outro de residência, que permitiriam a expansão das investigações de doenças próprias do Norte argentino, em lugares muitas vezes afastados dos centros urbanos. O projeto foi autorizado por várias pessoas, entre elas o engenheiro Manuel J. Claps, administrador geral da Rede Ferroviária do Estado, que ficou entusiasmado com o progresso incalculável que um trem com um vagão-laboratório certamente levaria para aquela região, muito seca e de difícil acesso, o que pude constatar quando saí de Salta, que fica entre a pré-cordilheira e a cordilheira dos Andes.

De 1909 a 1916, Chagas e sua equipe relataram, em várias publicações, 29 casos agudos, todos em Minas Gerais. Como se pode ler no artigo publicado em 1949 nas *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1.232 casos foram reconhecidos pelo trabalho realizado pelos pesquisadores da Mepra, o que mostra que a logística introduzida por Mazza foi fundamental para a avaliação

das condições de saúde da população que vivia na região Norte da Argentina. O trabalho de Salvador Mazza vem sendo retomado pelo pesquisador Miguel Angel Basombrio, tanto na parte experimental como no acompanhamento de pacientes chagásicos crônicos.

REFERÊNCIAS

BRUMPT, E. Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* et *Ornithodorus moubata* : cycle évolutif de ce parasite. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, 5: 360, 1912a.

BRUMPT, E. Pénétration du *Schizotrypanum cruzi* à travers la muqueuse oculaire saine. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, 5 : 724, 1912b.

BRUMPT, E. Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundatus* : rôle régulateur des hôtes intermédiaires. Passage à travers la peau. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, 6: 173, 1913.

CHAGAS, C. Sobre um trypanosoma do tatu, *Tatusia novencincta*, transmitido pela *Triatoma geniculata* Latr. (1811): possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. *Brasil Médico*, 26: 305, 1912.

CHAGAS, C. American trypanosomiasis: study of the parasite and of the transmitting insect. *Proceedings of the Institute of Medicine of Chicago*, 3: 220, 1921.

CHAGAS, C. Quelques aspects évolutifs du *Trypanosoma cruzi* dans l'insecte transmetteur. *Comptes Rendus de la Société Biologique*, 97: 829, 1927.

IGLESIAS, J. P. S. *Salvador Mazza, su vida, su obra: redescubridor de la enfermedad de Chagas*. San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy, 1990.

MAZZA, S. & JÖRG, M. E. Anatomía patológica de la enfermedad de Chagas y de animales naturalmente infectados por *Schizotrypanum cruzi*. *Actualidad Médica Mundial*, X: 277, 1940.

MUHLENS, D. & PETROCHI, Z. La tripanosomiasis humana. *Revista del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene*, IV: 290-303, 1925.

NICOLLE, C. Destin des maladies infectieuses. Paris: Éditions France Lafayette, 1993.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3: 276-294, 1911.

11

VICTOR NUSSENZWEIG, RUTH SONNTAG,
ARTHUR BIANCALANA, J. L. PEDREIRA DE FREITAS,
VICENTE AMATO NETO & JUDITH KLOETZEL

Ação de corantes trifenilmetânicos sobre o *Trypanosoma cruzi in vitro*: emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue.

O Hospital, 44(6): 731-744, 1953.

Victor Nussenzweig (1928)

Médico paulista, comprovou a ação da violeta de genciana na prevenção da transmissão da doença de Chagas transfusional. É professor de Medicina Preventiva da Universidade de Nova York.

Ruth Sonntag Nussenzweig (1928)

Parasitologista austríaca, é professora de Parasitologia Médica e Molecular da Universidade de Nova York e desenvolveu pesquisas sobre a doença de Chagas transfusional.

Arthur Biancalana (s.d.)

Desenvolveu pesquisas sobre Chagas transfusional, participando da equipe que comprovou a transmissão do mal de Chagas por transfusão de sangue e a ação preventiva da violeta de genciana na esterilização do sangue.

José Lima Pedreira de Freitas (1917-1966)

Médico nascido em São Paulo, realizou estudos clínicos, ecológicos e epidemiológicos sobre a doença de Chagas, bem como aperfeiçoou os métodos de diagnóstico existentes, ajudando a implementá-los em bancos de sangue.

Vicente Amato Neto (1927)

Médico e pesquisador da Universidade de São Paulo, dedica-se ao estudo das doenças infecto-parasitárias. Ajudou a comprovar a transmissão transfusional da doença de Chagas e desenvolveu pesquisas sobre a transmissão maternal e sobre o seu desenvolvimento em pacientes imunodeprimidos.

Judith Kloetzel (1929)

Pesquisadora do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, desenvolve estudos sobre imunologia da doenca de Chagas experimental. Integrou a equipe que comprovou a ação preventiva da violeta de genciana na esterilização do sangue.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

(Diretor: Prof. Dr. Samuel B. Pessôa)

AÇÃO DE CORANTES TRI-FENIL-METÂNICOS SÔBRE O *TRYPANOSOMA CRUZI* "IN VITRO". EMPRÊGO DA VIOLETA DE GENCIANA NA PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO DA MOLÉSTIA DE CHAGAS POR TRANSFUSÃO DE SANGUE

VICTOR NUSSENZWEIG (*)
RUTH SONNTAG (**)
ARTHUR BIANCALANA (***)
J. L. PEDREIRA DE FREITAS (****)
VICENTE AMATO NETO (*****)
JUDITH KLOETZEL (******)

Investigações recentes têm chamado a atenção para a elevada prevalência da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* entre candidatos a doadores em Bancos de Sangue, como também para a transmissão desta infecção pela hemoterapia. Assim, em Belo Horizonte, Pellegrino e col. (1951), num grupo de 576 indivíduos que se apresentaram ao Banco de Sangue do Hospital de Pronto Socorro, constataram 14 com reação de fixação do complemento positiva para a moléstia de Chagas. Na

---

(*) Médico estagiário no Departamento de Parasitologia.
(**) Acadêmica estagiária no Departamento de Parasitologia.
(***) Médico do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Fac. de Medicina da Univ. de S. Paulo (Diretor: Dr. Osvaldo Mellone).
(****) Livre-docente e Assistente do Departamento de Parasitologia.
(*****) Médico-residente da Clínica de Doenças Tropicais e Infectuosas do Hospital das Clínicas da Fac. de Med. da Univ. de S. Paulo (Diretor: Prof. Dr. João Alves Meira).
(******) Técnica do Departamento de Parasitologia.

Nota dos autores: Agradecemos a valiosa cooperação e as sugestões apresentadas pelos Drs. Francisco Berti, Michel Abu Jamra, Álvaro Cardoso, Rômulo R. Pieroni e Carlos da S. Lacaz. Agradecemos também a colaboração do acadêmico J. Goulart Barreto e dos médicos e funcionários do Serviço de Transfusão de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Capital de São Paulo, Faria e col. (1951), selecionando os candidatos a doadores de sangue, no Banco de Sangue do Hospital Municipal encontrou, entre 2.223 indivíduos, 92 epidemiològicamente suspeitos, dos quais 7 (7,6%) apresentaram reação de fixação do complemento positiva com antígeno de *T. cruzi*. Outra investigação efetuada na Capital de S. Paulo por Freitas e col. (1952), em dois Bancos de Sangue, um dêles instituição particular e outro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, evidenciaram a ocorrência de reação de fixação do complemento positiva, com antígeno de *T. cruzi*, em 2,2% de casos não selecionados. Passalacqua e col. (1953), no Banco de Sangue da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, verificaram uma incidência ainda mais elevada, ou seja de 4,1%. Biancalana e col. (1953), nos Bancos de Sangue do Hospital São Francisco de Ribeirão Prêto, da Beneficência Portuguêsa de Santos, da Santa Casa de Misericórdia de Santos, da Santa Casa de Misericórdia de São José do Rio Prêto e de Araguari, também pela reação de fixação do complemento, obtiveram as taxas de positividade de 21,1%, 0,0%, 0,0%, 14,9% e 19,1%, em relação, respectivamente, a 19, 28, 66, 134 e 225 candidatos a doadores. A gravidade do problema ficou ressaltada no trabalho de Freitas e col. (1952a), que verificaram a transmissão da infecção pela transfusão de sangue a 2 dos 17 pacientes até então em observação, que haviam recebido sangue de doadores com reação de fixação do complemento positiva.

Pellegrino e col. (1951) e Freitas e col. (1952), em seus trabalhos recomendam que, profilàticamente, se faça a reação de fixação do complemento entre os candidatos a doadores de sangue nos Bancos de Sangue onde haja possibilidade de ocorrerem indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. Esta medida, entretanto, é de aplicação difícil na prática, pelas dificuldades relativas à reação em muitas oportunidades, além de que certo número de candidatos a doadores teriam de ser excluídos em vista da grande disseminação da moléstia nos meios rurais. Por esta razão, iniciamos em 1951 pesquisas no sentido de encontrar uma droga que, adicionada ao sangue "in vitro", fôsse capaz de destruir o parasito sem, no entanto, torná-lo impróprio para a transfusão.

Inúmeros agentes químicos foram experimentados e os melhores resultados foram obtidos com corantes tri-fenil-metânicos. A ação dos outros agentes químicos experimentados será oportunamente comunicada.

Neste trabalho estudamos comparativamente o poder tripanossomicida de vários corantes tri-fenil-metânicos, a influência do pH do meio em que agem, além de problemas ligados ao seu emprêgo nas transfusões.

MATERIAL E MÉTODOS

As drogas estudadas foram adicionadas ao sangue citratado ou heparinizado, obtido por punção cardíaca de camundongos infectados com a cêpa Y do *T. cruzi*. Esta cêpa, isolada de um caso humano da doença, vem sendo mantida em laboratório por passagens sucessivas em camundongos de 20 a 30 dias, há cêrca de 3 anos. Seu comportamento em camundongos brancos foi estudado por Pereira da Silva e Nussenzweig (1953), que verificaram ser a mesma 100% infectante para êstes animais, mesmo usando-se inóculos contendo pequeno número de parasitos e, sua virulência, muito elevada, matando 93,7% dos camundongos de 19 a 79 dias, após um decurso bastante regular da infecção. Esta virulência se conservou mesmo quando o sangue contendo parasitos foi mantido por 21 dias em geladeira, fato êste que veio demonstrar que a simples conservação do sangue por alguns dias a baixa temperatura, sugerida por Faria e col. (1950), não afasta o perigo da transmissão da tripanossomíase americana.

Em poucas experiências, devidamente assinaladas, utilizamos a cêpa L do *T. cruzi*, isolada há 1 ano também de caso humano e mantida da mesma maneira em laboratório. Esta cêpa, infectante para 100% dos camundongos, produz uma infecção de decurso mais lento, levando à morte cêrca de 50% dos animais inoculados.

A utilização dessas cêpas virulentas do *T. cruzi* facilitou, evidentemente, o contrôle da ação das drogas sôbre o sangue infectado.

As experiências foram realizadas, colocando o sangue infectado (contendo 10 a 100 flagelados por 50 campos microscópicos (× 400)) em contacto com cada droga estudada e mantendo-o em geladeira por tempo variável. Quando, no contrôle da ação dos agentes em estudo, não se encontravam parasitos ao exame microscópico a fresco, o sangue era inoculado intraperitonealmente em camundongos. Em geral, as soluções das drogas foram adicionadas ao sangue de modo que, na mistura final, se tivesse 70% de sangue, a fim de que as experiências decorressem em condições semelhantes às empregadas rotineiramente em hemoterapia.

Em tôdas as experiências foi efetuada paralelamente a inoculação de testemunhos com sangue de camundongo infectado, igualmente diluído, e conservado durante o mesmo tempo em geladeira. O contrôle da infecção se fêz pelo exame microscópico a fresco (× 400), de uma gôta de sangue da cauda, realizado de 2 em 2 dias.

Após 30 dias, sacrificava-se a metade dos camundongos e prosseguia-se ao exame dos restantes por mais um mês, quando eram por sua vez necropsiados. De vários camundongos que, inoculados, não apresentaram infecção, foram examinados cortes

histológicos dos órgãos mais freqüentemente acometidos, tais como, o coração, o fígado, o baço, o cérebro e músculo esquelético.

Nas experiências realizadas com formas culturais do *T. cruzi* foi utilizada também a cêpa Y, mantida em meio de Nöller e repicada semanalmente com os cuidados preconizados por Freitas (1947).

A influência do pH sôbre a ação tripanossomicida dos corantes trifenil-metânicos foi estudada com essas formas culturais, suspensas em solução fisiológica. Foi utilizado um tampão de fosfato primário de potássio e fosfato secundário de sódio, em proporções variáveis, de acôrdo com o pH desejado. O pH foi controlado por intermédio de um potenciômetro portátil "Cambridge".

Foram experimentados os seguintes corantes:
Fucsina básica (Eimer & Amend., New York).
Rosanilina (Magenta I) — (Gruebler, Leipzig).
Verde de malaquita (Republic Chemical Corp., New York).
Cristais violeta (Hartman, Leddon Co., Philadelphia).
Metil violeta (Gruebler, Leipzig).
Violeta de genciana (Eli Lilly & Co., Indianópolis — Partida 5853-W89722) — Cloreto de hexametil-pararosanilina geralmente misturado com cloreto de pentametil-pararosanilina e cloreto de metil-pararosanilina.

As soluções foram feitas em solução glicosada isotônica, pois em sôro fisiológico a violeta de genciana não apresenta estabilidade (Burke e col., 1926). A solução de violeta de genciana, depois de filtrada, foi autoclavada e distribuída em ampolas de vidro escuro.

As experiências foram realizadas em condições tais que não se verificaram casos em que houvesse contaminação prejudicial; contribuiu para êsse fato o próprio poder bacteriostático e bactericida das drogas estudadas.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

1. *Ação de corantes tri-fenil-metânicos sôbre o* T. cruzi *"in vitro"*. — Procuramos inicialmente verificar quais as drogas dêste grupo de corantes que apresentam ação tripanossomicida mais intensa. Os corantes utilizados, na concentração final de 1: 2.000, foram adicionados ao sangue de camundongo infectado (cêpa Y), que foi examinado a fresco, a curtos intervalos, a fim de determinar o menor tempo necessário para a imobilização dos parasitos.

Coincidindo com o que já verificara Deschiens (1944), quanto à atividade antihelmíntica dêstes corantes e Tsuchiya (1936), quanto à sua ação amebostática e amebicida, em nossas

experiências com o *T. cruzi,* a violeta de genciana e o cristal violeta se mostraram mais ativos no grupo (Quadro I).

QUADRO I

Ação dos corantes tri-fenil-metânicos sôbre o T. cruzi

DROGA	CONCENTRAÇÃO	TEMPO PARA IMOBILIZAÇÃO
Violeta de genciana	1:2.000	5 minutos
Cristal violeta	1:2.000	15 minutos
Verde de malaquita	1:2.000	15 minutos
Metil violeta	1:2.000	80 minutos
Rosanilina	1:2.000	Vivos após 48 horas
Fucsina básica	1:2.000	Vivos após 48 horas

Conforme dados verificados no Quadro I, a ação dos corantes depende do tempo de contato com o parasito. A rosalinina e a fucsina básica não esterilizaram o sangue mesmo após 48 horas de contato; os parasitos, entretanto, apresentaram, após algumas horas, movimentos mais lentos.

Constatamos também que os tripanossomas em contato com as drogas mais ativas (violeta de genciana, cristal violeta, verde de malaquita e metil violeta) se coram, tomando o parasito aspecto granuloso. Posteriormente a coloração fica mais intensa e uniforme, os movimentos dos flagelados tornam-se mais lentos, imobilizando-se após tempo variável para cada droga.

2. *Influência do pH sôbre o poder tripanossomicida da violeta de genciana.* — Já constitui fato bem verificado que a atividade bacteriostática ou bactericida de certas substâncias pode sofrer grandes alterações em sua intensidade, condicionadas por modificações do pH do meio.

Stearn e Stearn (1924) observaram que as bactérias, quanto às reações tintoriais, se comportavam como anfóteros, tendendo em soluções alcalinas a reter corantes básicos e, em soluções ácidas, os corantes ácidos. Baseando-se nisto, êstes autores aventaram uma teoria para explicar o mecanismo do efeito bacteriostático dos corantes, considerando as bactérias como proteínas conjugadas que reagissem com os corantes (Stearn e Stearn, 1924a). Experimentalmente, verificaram que o poder inibidor dos corantes básicos é maior com o aumento da alcalinidade e decresce quando, pelo contrário, aumenta a acidez do meio. Assim, no que se refere por exemplo à violeta de genciana, corante básico, Stearn e Stearn (1926) verificaram que, enquanto no pH de 7,7 uma concentração de 1/50.000 inibia o crescimento do *B. aerogenes,* êsse corante no pH de 5,2,

mesmo na concentração de 1/1.000, era incapaz de inibir o crescimento do microrganismo.

A influência do pH foi notada também para outras substâncias bacteriostáticas, ainda que não corantes e, mais recentemente, para vários antibióticos (Eagle e col., 1952).

Foi também observada por Stearn e Stearn (1926) a reversibilidade da ação bacteriostática de vários corantes básicos, entre os quais a violeta de genciana e a para-rosanilina, pela simples acidificação do meio em que se encontrava a droga.

Verificou-se que a modificação do poder bacteriostático das drogas condicionada por variações do pH, é variável e está na íntima dependência dos microrganismos empregados. Certos autores interpretam mesmo o efeito da variação do pH como agindo primàriamente sôbre a célula e não sôbre o agente bacteriostático.

Baseados nessas observações, nos propusemos verificar quais as possíveis alterações do poder tripanossomicida da violeta de genciana, variando o pH do meio.

Duas séries de tubos contendo cultura lavada de *T. cruzi* foram colocadas em pH ácido (5,9) e alcalino (7,8), utilizando-se para isso, como referimos anteriormente, um tampão de fosfato primário de potássio e fosfato secundário de sódio. A violeta de genciana foi adicionada a cada série de modo que se obtivessem diluições progressivas da droga (Quadro II).

QUADRO II

Influência do pH sôbre a ação da violeta de genciana

CONCENTRAÇÃO	pH	TEMPO PARA IMOBILIZAÇÃO
1: 5.000	5,9	12 minutos
	7,8	2 minutos
1: 7.200	5,9	30 minutos
	7,8	2 minutos
1:10.000	5,9	80 minutos
	7,8	6 minutos
1:12.500	5,9	95 minutos
	7,8	9 minutos
1:20.000	5,9	Vivos após 135 minutos
	7,8	22 minutos

Concomitantemente, estudamos a ação do pH sôbre a vitalidade do *T. cruzi* e não notamos qualquer alteração de mobilidade dêsse flagelado em meio ácido e alcalino. Aliás, Packchanian (1953) assinalou a sobrevivência do *T. cruzi* em pH variando de 2 a 12.

As experiências realizadas mostraram que também no caso do *T. cruzi* a violeta de genciana tem maior poder tripanossomicida quando o pH do meio é alcalino. Assim, verifica-se pelo Quadro II que uma concentração de violeta de genciana a 1:12.500 imobilizou todos os tripanossomas dentro de 9 minutos em pH de 7,8 enquanto que, em pH de 5,9 o tempo de ação necessário para imobilizar os flagelados foi de 95 minutos. Resultados paralelos foram obtidos com tôdas as concentrações de violeta de genciana experimentadas.

Portanto, no caso de ser usada a droga em mistura com o sangue, a alcalinidade do meio ofereceria condições favoráveis para sua ação.

3. *Poder tripanossomicida da violeta de genciana.* — Como a violeta de genciana apresentou, nas experiências preliminares, elevado poder tripanossomicida, estudamos mais particularmente sua ação. No Quadro III estão resumidos os resultados

QUADRO III

Ação da violeta de genciana sôbre o T. cruzi

Concentração	Tempo de ação em horas	N.º de experiências	N.º total de camundongos inoculados	Camundongos com parasitemia
1: 4.000	24	5	48	0
	48	4	24	0
1: 5.000	2	1	3	3
	24	9*	56*	3*
	48	6**	68**	1**
1: 7.500	24	1	4	4
	48	3	9	1
	72	1	4	0
1:10.000	24	2	5	4
	48	2	8	2
	72	1	3	0
	96	1	3	0
	120	1	3	0
1:12.000	72	1	2	0
	96	1	3	0
1:15.000	72	1	4	1
1:20.000	120	1	2	1
	168	1	3	0

* Neste grupo, uma das experiências foi feita com a cêpa L do T. cruzi (5 camundongos inoculados) e nenhum apresentou parasitemia.

** Neste grupo, uma das experiências foi feita com a cêpa L do T. cruzi (11 camundongos inoculados) e nenhum apresentou parasitemia.

das diversas inoculações do sangue parasitado, que permaneceu por tempo variável em contato com diluições crescentes da droga.

Verifica-se que na concentração de 1 : 4.000, após tempo de ação de 24 ou 48 horas, houve aparente esterilização do sangue. Na concentração de 1 : 5.000, após 24 horas de contacto, entre os 56 camundongos inoculados, 3 apresentaram parasitemia enquanto que, após 48 horas, sòmente 1 dos 68 inoculados apresentou tripanossomas no sangue circulante. Nas outras concentrações verifica-se nítida influência do tempo de ação da droga sôbre seu poder tripanossomicida; para maiores diluições do corante a esterilização se processa sòmente após tempo mais prolongado do contato.

De 22 camundongos inoculados com sangue contendo o corante nas concentrações de 1:4.000 e 1:5.000, e que não apresentaram parasitemia, foram examinados cortes histológicos do coração, fígado, baço, cérebro e músculo esquelético, não tendo sido encontradas formas em leishmânia do *T. cruzi*.

Conforme referimos, tôda experiência realizada foi acompanhada pela inoculação de testemunhos, com o sangue de camundongos infectados que permanecia também em geladeira pelo mesmo espaço de tempo.

No Quadro IV, estão resumidos os resultados dessas inoculações.

QUADRO IV

Evolução da infecção nos camundongos testemunhos (cêpa Y)

Tempo em geladeira (em horas)	N.º de camundongos inoculados	N.º de camundongos com parasitemia	Período pré-patente em dias			N.º de camundongos mortos	Sobrevida em dias		
			Média	Máx.	Mín.		Média	Máx.	Mín.
24	48	48	4,4	8	2	18	14	23	5
48	42	42	4,5	7	1	40	16,8	23	7
72	12	12	3,7	6	2	12	16	24	9
96	2	2	8	—	—	1	22	—	—
120	5	5	6,2	10	5	5	22	33	15
168	3	3	5,7	9	4	3	14	21	13

Como vemos, a virulência da cêpa permaneceu elevada, mesmo após a permanência do sangue durante vários dias em geladeira.

Alguns camundongos, inoculados com sangue tratado por maiores diluições do corante, apresentaram infecção. Esta foi, porém, mais benigna, tendendo para a cronicidade e o período de incubação foi prolongado em relação ao dos camundongos testemunhos (comparar Quadros IV e V).

QUADRO V

Evolução da infecção nos camundongos que, inoculados com sangue contendo violeta de genciana, apresentaram parasitemia

DROGA		N.º DE CAMUNDONGOS INOCULADOS	N.º DE CAMUNDONGOS COM PARASITEMIA	PERÍODO DE INCUBAÇÃO EM DIAS	EVOLUÇÃO
Concentração	Tempo de ação em horas				
1: 5.000	24	56	3	23-22-27	Crônica; sacrificados.
	48	68	1	20	Crônica; sacrificado.
1: 7.500	24	4	4	16-20-16-16	1 morto aos 34 dias. 3 com infecção crônica; sacrificados.
	48	9	1	19	Crônica; sacrificado.
1:10.000	24	5	4	20-15-18-15	1 morto aos 29 dias. 1 morto aos 30 dias. 3 com infecção crônica; sacrificados.
	48	8	2	17-21	1 morto aos 35 dias. 1 com infecção crônica; sacrificado.
1:20.000	72	4	1	16	Crônica; sacrificado.
	120	2	1	20	Crônica; sacrificado.

4. *Toxicidade da violeta de genciana.* — Em vista dos resultados obtidos, procuramos verificar se a violeta de genciana apresenta alguma atividade hemolítica nas concentrações em que mostrou efeito útil.

Para isto, a droga foi adicionada a sangue preservado em meio de A.C.D. (glicose: 3,3 g, citrato de sódio: 1,33 g, ácido cítrico: 0,47 g e água esterilizada q.s.p. 100 cc), de modo que a concentração final do corante fôsse de 1:5.000. O frasco contendo o sangue foi guardado por 8 dias em geladeira, sendo que em duas ocasiões, após 24 horas e no fim dos 8 dias, foi retirada uma amostra do plasma para a pesquisa de hemoglobina, efetuada por processo espectrofotométrico, pelo Dr. R.P. Pieroni. Esta verificação apresentou algumas dificuldades, uma vez que o plasma se achava colorido pela violeta de genciana. Entretanto, sendo distintas as curvas de absorção da hemoglobina e da violeta de genciana, foi possível demonstrar que não houve, no sangue em experiência, hemólise sensìvelmente maior do que aquela verificada no sangue testemunho conservado em geladeira pelo mesmo número de dias.

Além disso, a transfusão de sangue contendo violeta de genciana, como referiremos mais adiante, após 24 ou 48 horas do contato não determinou reação transfusional.

A violeta de genciana já é empregada há muito tempo no tratamento de diversas moléstias, principalmente de helmintía-

ses, sendo pois sua ação tóxica já bem estudada, quer quando usada "per os" ou por via endovenosa. Young e col. (1924), estudaram a toxicidade da droga e sua ação nas septicemias, verificando que em coelhos a dose de 5 a 10 mg/kg por via endovenosa era bem tolerada; resultado semelhante foi obtido por Gatch e col. (1925) com solução do corante em glicose a 4%, cloreto de sódio a 0,9% ou água destilada. Burke e col. (1926) mostraram em coelhos que as soluções de violeta de genciana em bicarbonato de sódio eram, de um modo geral, menos tóxicas do que as soluções aquosas, mais ácidas.

No tratamento da oxiuríase, Wright e col. (1940) referem que a violeta de genciana pode ser administrada endovenosamente, com segurança, na dose de 0,25 g para um homem de 50 kg. Young e col. (1924) não obtiveram reações tóxicas, no tratamento de septicemias, com doses de 5 a 7 mg/kg; em um caso, injetaram 40 ml da droga a 1% sem efeitos colaterais. Reed e col. (1924) injetaram em um paciente 35 ml da droga a 1%, sem quaisquer manifestações.

Alguns sautores, como Hunt e col. (1928), notaram uma coloração azulada da pele e mucosas, de curta duração, após injeção endovenosa da droga, referindo ainda ocasional aparecimento de náuseas e flebite no local da injeção.

No tratamento da estrongiloidíase a dose preconizada, por via endovenosa, por Belding (1952) e Craig e Faust (1945) é de 25 ml a 0,5% em dias alternados. Palmer (1950) utilizou, no tratamento dessa helmintíase, doses de 20 ml a 0,5%; as injeções foram administradas a 45 doentes durante 20 dias seguidos, não tendo sido notado qualquer efeito tóxico.

Com a finalidade de confirmar-se a inocuidade da droga em condições de transfusão, tem sido a violeta de genciana adicionada ao sangue, no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na dose de 0,1 g para 500 ml de sangue preservado (1:5.000). O corante, preparado na concentração de 0,5% em sôro glicosado isotônico, foi ampolado e adicionado ao sangue na dose citada. Até o presente momento já foram realizadas 46 transfusões com a droga.

Em 21 casos os receptores puderam ser acompanhados mais minuciosamente, por meio de exames laboratoriais, tendo sido feitos, em todos, hemograma e exame de urina, antes e depois da transfusão. Êles eram, em sua maioria, portadores de leucemia, moléstia de Hodgkin ou sarcoma, estando outros em período pós-operatório. O sangue contendo o corante ainda não foi empregado em casos de choque.

Em nenhum dos casos foi verificada qualquer sintomatologia que se pudesse atribuir à ação da droga: não observamos o aparecimento de flebite no local da injeção, nem foi notada coloração azulada da pele ou mucosas.

Como as soluções de violeta de genciana em água destilada são muito ácidas, diminuindo ainda o pH da solução com o decorrer do tempo, talvez os casos de flebite mencionados na literatura fôssem ocasionados pela acidez do corante. Além disto, no tratamento de helmintíases, a droga é empregada em maior concentração. O elevado poder tampão do sangue' e a maior diluição da droga explicariam a ausência de flebite nos nossos casos.

COMENTÁRIOS

O conjunto das experiências realizadas indica ser elevado o poder tripanossomicida da violeta de genciana "in vitro", devendo-se acentuar o fato de termos trabalhado com cêpas muito virulentas e sangue com elevado número de parasitos, o que dificilmente sucederia em condições de transfusão.

Não exercendo a droga atividade hemolítica, nas condições citadas, e considerando sua baixa toxicidade, julgamos possível o seu emprêgo na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. Numa nota prévia recentemente publicada (Nussenzweig e col., 1953), recomendavamos que o sangue suspeito, antes de ser transfundido, fôsse submetido por 24 horas à ação do corante, numa concentração de 1:5.000. Em vista, porém, dos resultados de maior número de experiências realizadas desde então, julgamos mais segura a utilização do corante na concentração de 1:4.000 (0,125 g para 500 ml de sangue), devendo o tempo de contato em geladeira ser de, pelo menos, 24 horas. Nesta dose a droga não apresenta toxicidade para o homem, sendo rotineiramente empregada no tratamento de helmintíases. As transfusões realizadas no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sem quaisquer reações colaterais, confirmam, aliás, êste fato. Julgamos, pois, que na impossibilidade de ser realizada a reação de fixação do complemento entre candidatos a doadores suspeitos de estarem infectados pelo *T. cruzi* por dados epidemiológicos, a violeta de genciana deve ser adicionada aos sangues profilàticamente.

Sendo a violeta de genciana um corante de composição complexa e variável de acôrdo com a procedência do produto, realizamos algumas experiências com o cristal violeta, um dos componentes da violeta de genciana, cuja composição química é constante, apresentando, além disso, a vantagem de ser mais solúvel. Segundo os dados obtidos até o momento, tudo parece indicar que êste corante tem ação semelhante àquela da violeta de genciana. São, porém, necessários estudos mais completos sôbre seu poder tripanossomicida e toxicidade, para que possa ser indicado o seu emprêgo em substituição à violeta de genciana.

RESUMO

Em vista da gravidade do problema da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão, os AA. estudaram a possibilidade de eliminar o **T. cruzi** dos sangues destinados à hemoterapia. Melhores resultados foram obtidos com os corantes do grupo tri-fenil-metânico e, em particular, com a violeta de genciana. Algumas experiências indicaram também que o cristal violeta apresenta atividade semelhante à da violeta de genciana. As experiências foram realizadas colocando as drogas em contato com o sangue de camundongos infectados com cêpas muito virulentas do **T. cruzi**, mantendo-o em geladeira por tempo variável. O poder tripanossomicida foi controlado pelo exame a fresco do sangue, com posterior inoculação em camundongos. Depois de efetuado contrôle parasitológico dêsses animais durante 2 meses, foram examinados cortes histológicos dos órgãos mais freqüentemente acometidos pela tripanossomíase.

A violeta de genciana, numa concentração de 1:4.000, após o tempo de contacto de 24 horas, esterilizou o sangue de camundongos infectados, sendo que, em concentrações menores, foi necessário maior tempo de ação.

A ação da violeta de genciana sôbre o **T. cruzi** "in vitro" é mais intensa quando o pH do meio em que age é alcalino.

Os AA. verificaram que êste corante não apresenta atividade hemolítica apreciável, não tendo sido observados efeitos tóxicos nas condições experimentadas. Em 46 transfusões de 500 ml de sangue contendo 0,1 g da droga, não notaram quaisquer sinais ou sintomas de intolerância ou intoxicação o que, aliás, coincide com a experiência de outros autores que empregaram a violeta de genciana endovenosamente no tratamento das helmintíases ou septicemias.

Em vista dos resultados obtidos, os AA. recomendam que, quando não seja possível realizar-se a reação de fixação do complemento em casos de candidatos a doadores suspeitos de estarem infectados pelo **T. cruzi**, a violeta de genciana seja adicionada ao sangue profilàcticamente, na concentração de 1:400, devendo o tempo de contato ser, no mínimo, de 24 horas.

SUMMARY

In view of the seriousness of the problem of transmitting Chagas' disease through blood transfusions, the AA. studied the possibility of getting blood to be used for hemotherapy free of **T. cruzi.** Best results were obtained with dyes of the tri-phenil-methanic group and especially with gentian violet. Some experiments also indicated that crystal violet has an activity similar to that gentian violet. Experiments were made maintaining mice's blood infected with heighly virulent strains of **T. cruzi** in contact with the drugs, in the refrigerator for different periods of time.

The trypanocidal activity was controlled through fresh wet blood film examinations and subsequent innoculation in mice. After a parasitological control of these animals for a period of 2 months, histological preparations of organs most commonly affected by trypanosomes were examined.

Gentian violet, in a concentration of 1:4.000 and after 24 hour's, contact, killed the trypanosomes in infected mice's blood, while with lower concentrations a longer contact time was necessary.

Gentian violet's activity against **T. cruzi** "in vitro" is more intense in an alcaline medium.

The AA. verified that this dye has no appreciable hemolytic activity, and no toxic effects where observed under the conditions it has been used. In 46 blood transfusions of 500 cc containing 0,1 gr. of the drug no signs or symptoms of intollerance or intoxication were observed. This agrees with results reported by other AA. which have employed gentian violet intravenously for treatment of helminthiasis and septicemias.

In view of the results obtained, the AA. recommend that should it be impossible to make the complement fixation test for Chagas' disease, and in cases of blood donor candidates epidemiologically suspect of being infected with T. cruzi, gentian violet should be mixed with the blood as a prophylactic measure, in a concentration of 1:4.000, the time of contact being at minimum 24 hours.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELDING, D. L. — 1952 — Clinical Parasitology. — Appleton Century-Crofts Inc., New York, 1139 pp.

BIANCALANA, A., FREITAS, J. L. PEDREIRA DE, AMATO NETO, V., NUSSENZWEIG, V. e SONNTAG, R. — 1953 — Investigações sorológicas sôbre doença de Chagas entre candidatos a doadores em Bancos de Sangue nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. — Em publicação n'O Hospital.

BURKE, V. e NEWTON, J. L. — 1926 — Preparation of gentian violet solutions for intravenous injection. — J.A.M.A., 86: 529-534.

CRAIG, C. F. e FAUST, E. C. — 1945 — Clinical Parasitology. — Lea & Febiger, Philadelphia, 871 pp.

DESCHIENS, R. — 1944 — L'action anthelminthique des colorants triphénylméthaniques. — Bull. Soc. Path. Exot., 37:111-125.

EAGLE, H., LEVY, M. e FLEISCHMAN, R. — 1952 — The effect of the pH of the medium on the antibacterial action of penicillin, streptomicin, chloraphenicol, terramycin, and bacitracin. — Antibiot. and Chemother., 2: 563-575.

FARIA, R. — 1951 — Sífilis, maleita, doença de Chagas e transfusão. — Fol. Clin. et Biol., 17: 113-117.

FARIA, R., MELLO, N. R. e MURAT, L. G. — 1950 — Contribuição para o estudo médico e social do doador de sangue. — Fol. Clin. et Biol., 16: 158-168.

FREITAS, J. L. PEDREIRA DE — 1947 — Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório. — Tese Fac. Med. Univ. São Paulo, 160 pp.

FREITAS, J. L. PEDREIRA DE, BIANCALANA, A., AMATO NETO, V., NUSSENZWEIG V., SONNTAG, R. e BARRETO, J. G. — 1952 — Moléstia de Chagas em Bancos de Sangue na Capital de S. Paulo. — O Hospital, 41: 229-236.

FREITAS, J. L. PEDREIRA DE, BIANCALANA, A., AMATO NETO, V., NUSSENZWEIG, V., SONNTAG, R. e BARRETO, J. G. — 1952a — Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. — Rev. Paul. Med., 40: 361-40.

GATCH, W. D., TRUSLER, H. M. e OWEN, J. E. — 1925 — Treatment of general septicemia by gentian violet and mercurochrome 220 soluble. — J.A.M.A., 85: 894-899.

HUNT, R., Mc CANN, W. S., ROWNTREE, L. G., VOEGTLIN, C. e EGGLESTON, C. — 1928 — Intravenous use of dyestuffs as antiseptics. — J.A.M.A., 90: 764-767.

NUSSENZWEIG, V., SONNTAG, R., BIANCALANA, A., FREITAS, J. L. PEDREIRA DE, AMATO NETO, V. e KLOETZEL, J. — 1953 — Ação da violeta de genciana sôbre o **T. cruzi** in intro: sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão. — Rev. Paul. Med., 42: 57-58.

PACKCHANIAN, A. — 1953 — Chemotherapy of experimental Chagas' disease with thirty antibiotics. — Am. J. Trop. Med. and Hyg., 2: 243-253.

PALMER, E. D. — 1950 — A note on the treatment of strongyloidiasis with intravenous gentian violet. — Am. J. Trop Med., **30**: 91-92.

PASSALACQUA, C. de S. P., AMATO NETO, V., ZATZ, I. e DAMASCO, A. — 1953 — Incidência da doença de Chagas entre candidatos a doadores de um Banco de Sangue de São Paulo. Inquérito sorológico. — O Hospital, 43: 443-447.

PELLEGRINO, J., BORROTCHIN, M., LEITE, G. e BRENER, Z. — 1951 — Inquérito sôbre a doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. — Mem. Inst. Osw. Cruz, 49: 555-564.

PEREIRA DA SILVA, L. H. e NUSSENZWEIG, V. — 1953 — Sôbre uma cêpa de **Trypanosoma cruzi** altamente virulenta para o camundongo branco. — Trabalho apresentado ao Departamento de Higiene e Medicina Tropical da Associação Paulista de Medicina, em 4 de agôsto de 1953.

REED, A. C. e LUM, D. D. — 1924 — Toxic results of dye treatment of septocemia. — J.A.M.A., 83: 1681-1682.

STEARN, E. W. e STEARN, A. E. — 1924 — The chemical mechanism of bacterial behavior. 1. Behavior towards dyes — factors controlling the gram reaction. — J. Bact., 9: 463-477.

STEARN, A. E. e STEARN, E. W. — 1924a — The chemical mechanisn of bacterial behavior. 3. The problem of bacteriostasis. — J. Bact., 9: 491:509.

STEARN, E. W. e STEARN, A. E. — 1926 — Conditions and reactions defining dye bacteriostasis. — J. Bact., 11: 345-357.

TSUCHIYA, H. — 1936 — The effects of dyes on **Endamoeba histolytica** in vitro. — J. Lab. and Clin. Med., 21: 1028-1035.

WRIGHT, W. H. e BRADY, F. J. — 1940 — Studies on oxyuriasis. XXII. The efficacy of gentian violet in the treatment of pinworm infestation. — J.A.M.A., 114: 861-866.

YOUNG, H. H. e HILL, J. H. — 1924 — The treatment of septicemia and local infections by intravenous injections of mercurochrome 200 soluble and of gentian violet. — J.A.M.A., 82: 669-675.

Comentários

Controle da Doença de Chagas por meio da Quimioprofilaxia do Sangue: primeiros passos para o controle da transmissão transfusional

Marco Aurélio Krieger
Laboratório de Genômica Funcional
Instituto Carlos Chagas/Fiocruz

A descrição da ação profilática do emprego de corantes trifenilmetânicos na transmissão da doença de Chagas realizada por Nussenzweig e colaboradores constituiu importante marco no controle da transmissão dessa doença via transfusão sangüínea. Essa estratégia é utilizada ainda em nossos dias em áreas de alta endemicidade, ou onde a triagem sorológica não está disponível (WHO, 2002). O contexto histórico desse trabalho coincide com os primeiros relatos de transmissão da doença de Chagas no final da década de 1940, início da década de 1950 (Pellegrino, 1949; Freitas *et al.*, 1952). Essas comprovações acontecem ainda concomitantemente ao desenvolvimento da hemoterapia no Brasil e no mundo devido aos progressos científicos iniciados após o término da II Guerra Mundial e ao crescimento da demanda por transfusões de sangue. Esses fatos levaram a hemoterapia brasileira a ser caracterizada como uma especialidade médica, com a inauguração de diversos bancos de sangue e o conseqüente aumento da prática de transfusão sangüínea no país (Junqueira, Rosenblit & Hamerschlak, 2005). A transmissão transfusional do *Trypanosoma cruzi* havia sido comprovada desde 1950 e foi considerada problema grave de saúde pública; estima-se que, ao início da década de 1980, cerca de vinte mil novos casos de doença de Chagas transfusional surgiam anualmente no Brasil (Dias & Schofield, 1998).

O grupo de Nussenzweig e colaboradores publicou em 1953 dois importantes trabalhos (Nussenzweig *et al.*, 1953a, 1953b) inspirados em relatos da literatura sobre a ação de corantes trifenilmetânicos no controle de outros protozoários e também em helmintos (Tsuchiya, 1936; Deschiens, 1944).

Os experimentos descritos nesses trabalhos pelo grupo do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram realizados *in vitro*; os autores fizeram uma avaliação sistemática de diferentes corantes trifenilmetânicos (fucsina básica, rosanilina, verde de malaquita, cristais violeta, metil violeta e violeta de genciana). Além de testar esses diferentes corantes, também avaliaram diferentes concentrações de violeta de

genciana, assim como a influência do pH sobre o poder tripanossomicida deste corante, que obteve os melhores resultados nos experimentos iniciais.

Um fator muito importante do modelo utilizado pelos pesquisadores foi a utilização de cepas altamente virulentas para camundongos: a cepa Y (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953) e, adicionalmente, a cepa L, isolada e mantida de forma semelhante ao descrito para a cepa Y. Nesses experimentos foi inoculado elevado número de parasitas, extraídos por punção cardíaca de camundongos com infecção aguda. Um ponto importante a ressaltar é a utilização de um grande número de animais para o refinamento da dosagem de violeta de genciana e o tempo de contato que permitiria a eliminação do parasita do sangue. Dessa forma, os autores conseguiram demonstrar com o conjunto de experimentos "o elevado poder tripanossomicida da violeta de genciana '*in vitro*', devendo-se acentuar o fato de termos trabalhado com cepas muito virulentas e sangue com elevado número de parasitas o que dificilmente sucederia em condições de transfusão" (Nussenzweig *et al.*, 1953b).

A atividade tripanossomicida da violeta de genciana foi caracterizada muitos anos depois como a que ocorre mediante a geração de radicais livres, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila, radicais estes que são tóxicos para o parasita (Docampo & Moreno, 1990; Ramirez *et al.*, 1995).

Os autores, com base nesses experimentos, propuseram a utilização do corante na concentração de 1:4000 (0,125g para 500 ml de sangue) por período de 24 horas em geladeira, como medida profilática em casos de não ser possível a realização de testes de fixação do complemento, que consistia no teste sorológico disponível à época. Essas medidas profiláticas foram recomendadas pelas principais agências internacionais de saúde, como é o caso da WHO, e fizeram parte da iniciativa de erradicação da doença de Chagas no Cone Sul e nas Américas por seu baixo custo, facilidade de execução e eficácia mesmo em laboratórios precariamente instalados.

A partir de 1950 cresceu o número de inquéritos sorológicos entre doadores e candidatos à doação de sangue para a doença de Chagas em toda a América, inicialmente com muitas dificuldades causadas por problemas na padronização da reação de fixação de complemento. Nas décadas seguintes, esses inquéritos foram facilitados pela incorporação de técnicas sorológicas mais adequadas e reprodutíveis, como a imunofluorescência, a hemaglutinação indireta e, mais recentemente, a de Elisa (Dias & Schofield, 1998). Atualmente, as perspectivas do controle da transmissão transfusional são muito boas, especialmente com a implantação de triagem sistemática de doadores para a sorologia chagásica (Dias, 2006). De toda forma, a quimioprofilaxia da transmissão da doença de Chagas cumpriu importante papel nos esforços de controle da moléstia e, como mencionado, constituiu significativo avanço no controle da transmissão da doença de Chagas via transfusão sanguínea.

REFERÊNCIAS

DESCHIENS, R. L'action anthelminthique des colorants triphénylméthaniques. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, 37: 111-125, 1944.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 28(2): 81-87, 2006.

DIAS, J. C. P. & SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na iniciativa do Cone Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(4): 373-383, 1998.

DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. The metabolism and mode of action of gentian violet. *Drug Metabolism Reviews*, 22: 161-178, 1990.

FREITAS, J. L. P. *et al.* Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Revista Paulista de Medicina*, 40: 36-40, 1952.

JUNQUEIRA, P. C.; ROSENBLIT, J. & HAMERSCHLAK, N. História da hemoterapia no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 27(3): 201-220, 2005.

NUSSENZWEIG, V. *et al.* Ação da violeta de genciana sobre o *T. cruzi in vitro*: sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão. *Revista Paulista de Medicina*, 42: 57-58, 1953a.

NUSSENZWEIG, V. *et al.* Ação de corantes trifenilmetânicos sobre o *Trypanosoma cruzi in vitro*: emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. *O Hospital*, XLIV(6): 25-42, 1953b.

PELLEGRINO, J. Transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue: primeiras comprovações sorológicas em doadores e candidatos a doadores. *Revista Brasileira de Medicina*, 6: 297-301, 1949.

PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica*, 20(3): 191-207, 1953.

RAMIREZ, L. E. *et al.* Prevention of transfusion-associated Chagas' disease by sterilization *T. cruzi*-infected blood with gentian violet, ascorbic acid and light. *Transfusion*, 35: 226-230, 1995.

TSUCHIYA, H. The effects of dyes on Entamoeba Histolytica *in vitro*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 21: 1.028-1.035, 1936.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. *Control of Chagas Disease*. Geneva: WHO, 2002.

Da Violeta de Genciana à Sorologia: o controle da transmissão da doença de Chagas nos bancos de sangue

Octavio Fernandes
Catia Sodré
Laboratório Integrado de Pesquisas Médicas
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Ângela Junqueira
Laboratório de Doenças Parasitárias
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

O artigo de Nussenzweig e colaboradores, de 1953, descreve o uso da violeta de genciana como tripanossomicida em sangue a ser potencialmente transfundido. A transmissão transfusional do *Trypanosoma cruzi* foi mencionada formalmente por Emmanuel Dias como um possível e importante problema de saúde pública nas Américas em 1944 (Mazza *et al.*, 1936; Dias, 1945). Em 1949, Pellegrino encontrou os primeiros doadores de sangue infectados pelo parasito e, em 1952, Freitas e colaboradores detectaram casos da doença de Chagas transfusional na região de São Paulo, Brasil (Freitas *et al.*, 1952; Pellegrino, 1949).

Na realidade, conhecia-se o potencial de transmissão da doença de Chagas pelo sangue desde sua descrição, em 1909. Carlos Chagas relata um dos experimentos que comprovava tal possibilidade:

> Imediatamente após esta verificação inoculamos duas cobaias e um sagüi com sangue retirado, por punção venosa, da criança. As cobaias morreram no sexto dia após a inoculação e no pulmão de ambas encontramos formas parasitárias inteiramente idênticas às que temos estudado no ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. (Chagas, 1909)

Pesquisas sorológicas realizadas durante a década de 50 do último século, em diversos bancos de sangue do país, revelavam taxas de positividade que atingiam até 19,1%, dependendo da região estudada. Dessa forma, fazia-se necessário, naquela ocasião, que outras medidas fossem pesquisadas para se evitar a transmissão transfusional da doença de Chagas. Na época, a Organização Mundial da Saúde (OMS) determinava a importância de se empregar a reação de fixação de complemento nos doadores. O rastreamento de sangue com o emprego de técnicas sorológicas como a fixação de complemento não era o ideal. Limitações da própria técnica, como a sua reprodutibilidade devido à instabilidade do complemento utilizado na reação e a sensibilidade em torno de 92%, traziam complicações para o seu uso em cenários de banco de sangue. Considerando-se tais dificuldades na prática dessa reação, chamou-se a atenção para a necessidade de se aplicar substâncias tripanossomicidas no sangue infectado.

Diante desse quadro, nos anos 50, inspirados pelas idéias de Paul Erlich, um estudante de medicina que na década de 1880 começara a analisar a ação de centenas de corantes sintéticos em modelos laboratoriais e em amostras clínicas (Silva, 2002), dois jovens cientistas brasileiros – Victor Nussenzweig e Ruth Sonntag – e sua equipe mostraram que a violeta de genciana, quando adicionada a amostras de sangue contaminadas com o *T. cruzi*, prevenia a transmissão do parasito por meio da transfusão. Os estudos de Nussenzweig de 1953 demonstraram, de forma elegante e utilizando todos os possíveis controles, que a adição de violeta de genciana a uma concentração de 1:4000 e tempo de contato de pelo menos 24 horas com o sangue contaminado era capaz de matar o *T. cruzi*, trazendo a perspectiva de que esta droga fosse empregada em bancos de sangue de áreas endêmicas como medida profilática.

A violeta de genciana (cloreto de pararosanilina) é um corante catiônico, que tem sido usado na prática médica há vários anos, principalmente como agente anti-séptico e antimicótico. Nenhum efeito colateral grave foi observado com o uso tópico da violeta de genciana; entretanto, sua administração oral pode causar irritação gastrintestinal e a injeção intravenosa, além de promover uma diminuição da concentração leucocitária, pode promover uma ação deletéria nas plaquetas (Docampo & Moreno, 1990; Wendel, 2002). Surpreendentemente, nenhum efeito colateral agudo e tóxico foi reportado depois da administração de grandes quantidades de sangue tratado com violeta de genciana (corante pertencente à classe dos trifenilmetânicos, dos quais alguns são reconhecidos por seus efeitos carcinogênicos em animais e humanos) (Docampo & Moreno, 1990).

Apesar de ter sido usada durante anos como agente quimioprofilático em amostras de sangue contaminado pelo *T. cruzi*, a relação mecanismo de ação da violeta de genciana – parasito foi e ainda é pouco estudada. Assim como os principais agentes tripanossomicidas, pelo menos em parte, a violeta de genciana promove seu efeito tóxico induzindo o estresse oxidativo no parasito (Docampo *et al.*, 1983; Docampo & Moreno, 1984; Temperton *et al.*, 1998). A formação do radical superóxido (O_2^-) pelo ciclo redox do *T. cruzi* tem sido considerada um dos possíveis mecanismos de ação da violeta de genciana (Reszka, Cruz

& Docampo, 1986; Docampo *et al.*, 1988; Docampo, Moreno & Cruz, 1988; Temperton *et al.*, 1998). O *T. cruzi*, assim como outros tripanossomatídeos, apresenta tanto um sistema antioxidante não enzimático, em que o componente mais importante é a tripanotiona, um ditiol de baixo peso molecular, como um enzimático. Porém, este último não inclui a catalase nem a glutationa peroxidase (Fairlamb & Cerami, 1992), importantes enzimas antioxidantes presentes na maioria dos organismos eucariotos. Dessa ausência decorre, provavelmente, menor habilidade desses parasitos em remover o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em contrapartida, a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi detectada também em *T. cruzi* (Boveris & Stoppani, 1977). Sob a ação das SODs, o ânion superóxido é transformado em peróxido de hidrogênio, que é tóxico e cuja remoção é essencial para a sobrevivência da célula. A superexpressão da Fe-SOD em *T. cruzi* mostrou maior suscetibilidade desses parasitos ao efeito tripanossomicida da violeta de genciana, assim como do benzinidazol, provavelmente devido a um desequilíbrio do sistema de defesa oxidativo, que resultou no aumento da produção de H_2O_2 (Temperton *et al.*, 1998). Aliado a isso, esse corante também exerceu efeito inibitório, *in vitro*, da tripanotiona redutase de *T. cruzi*, que faz parte do sistema tripanotiona – tripanotiona redutase que atua na etapa de neutralização do peróxido de hidrogênio (Moreno, Carnieri & Docampo, 1994).

Uma ação fotodinâmica da violeta de genciana também foi demonstrada em *T. cruzi* (Docampo *et al.*, 1983; Docampo, Moreno & Cruz, 1988). A luz visível promoveu a fotorre-dução do corante para um *carbon centered radical*. Sob condições aeróbicas, esse radical livre se auto-oxida, gerando o ânion superóxido cuja dismutação promove o peróxido de hidrogênio. A irradiação com luz visível na presença de ascorbato de sódio reduziu a dose efetiva e o tempo de contato do corante com o sangue infectado por *T. cruzi* (Docampo, Moreno & Cruz, 1988). Outro possível alvo de atuação da violeta de genciana é a mitocôndria. Estudos realizados em mitocôndrias de fígado de ratos e de *T. cruzi* mostraram um efeito desacoplador da violeta de genciana sob a fosforilação oxidativa mitocondrial. Isso foi traduzido pelo bloqueio do controle respiratório, parada da síntese de ATP, aumento da atividade ATPase, diminuição do efeito inibitório da oligomicina no estágio 3 da respiração e, morfologicamente, aumento da mitocôndria *in situ* (Docampo *et al.*, 1988; Gadelha *et al.*, 1989). O potencial de membrana mitocondrial também foi dissipado pela atuação do corante, resultando no efluxo de cálcio da mitocôndria que culmina no rompimento da homeostase deste íon, contribuindo de maneira significativa para o efeito tripanossomicida da violeta de genciana (Docampo *et al.*, 1993).

Um dos grandes valores do artigo de Nussenzweig foi chamar a atenção para o desenvolvimento de ferramentas que evitassem a transfusão sangüínea da doença de Chagas. O controle da transmissão transfusional pelo *T. cruzi* foi conseguido com a evolução dos testes sorológicos, que se tornaram ao longo do tempo mais otimizados, sensíveis e específicos na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* (Dias & Schofield, 1998).

Um dos métodos sorológicos pioneiros utilizava a reação de fixação de complemento e foi denominado de Guerreiro & Machado, em homenagem aos pesquisadores que desenvolveram o ensaio em doença de Chagas. Empregando como antígeno extratos parasitários obtidos de baço de cães jovens infectados experimentalmente, esses autores conseguiram detectar anticorpos anti-*T. cruzi* em 68 dos 102 ensaios praticados com soros chagásicos de diversas formas da doença.

Dentre os mais variados métodos desenvolvidos até então, os que permaneceram e têm sido empregados na rotina laboratorial de detecção de anticorpos até hoje são a aglutinação, a imunofluorescência e os ensaios imunoenzimáticos. Este último é o método de escolha nos

bancos de sangue, devido à sua possibilidade de automatização, que permite a realização de várias amostras em curto espaço de tempo.

Uma grande evolução foi alcançada na década de 90 com a obtenção de frações antigênicas por biologia molecular (Frasch & Reyes, 1990; Umezawa *et al.*, 2004), levando à utilização dos antígenos recombinantes. Na mesma década foi verificada a reatividade de peptídeos sintéticos, derivados de seqüências repetitivas de aminoácidos, na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* (Vergara *et al.*, 1992). Essa tecnologia possibilitou o emprego de novos antígenos que tornaram os testes sorológicos mais sensíveis e específicos (Umezawa *et al.*, 2004).

Associado ao avanço dos procedimentos sorológicos, que possibilitou a identificação e com isso a exclusão de portadores assintomáticos e crônicos parasitados da relação de doadores, duas outras ações possibilitaram a drástica diminuição da transmissão por transfusão no Brasil: (i) a implementação, pelo Ministério da Saúde, de portarias que obrigam à realização, na triagem sorológica de todos os doadores de sangue, de testes para os seguintes agravos: hepatite B; hepatite C; HIV-1 / HIV-2; doença de Chagas; sífilis, ALT (um teste) HTLV I / II (RDC Nº 153 /MS), e (ii) a proibição de pagamento a doadores nos bancos de sangue. A implementação de políticas nacionais de controle em bancos de sangue em alguns outros países da América Latina tem também proporcionado uma drástica redução no risco de transmissão por transfusão (WHO, 2002).

Além de legislação específica sobre a qualidade da hemoterapia, vêm sendo implementados laboratórios nacionais e regionais de referência, tendo como meta uma boa sorologia pré-transfusional dos doadores, o que tem sido gradualmente alcançado. Observa-se ainda a progressiva diminuição na prevalência da infecção chagásica entre doadores e também o progressivo deslocamento dos doadores infectados para grupos etários mais elevados, como fruto do controle vetorial e do próprio descarte de doadores soropositivos em doações anteriores. As análises realizadas revelam dados e tendências nos países autóctones da infecção, sendo mais preocupante a situação da Bolívia, com maiores taxas de prevalência e menores de cobertura do programa (Dias & Schofield, 1998, 2002).

O mais recente desafio na transmissão transfusional se faz presente nos países considerados não endêmicos, que não realizam triagem em seus bancos de sangue, apesar de apresentarem número crescente de imigrantes das áreas endêmicas clássicas da doença de Chagas. Devido à falta de triagem de doadores, o risco de transmissão transfusional por transplante de órgãos, entre outras formas de transmissão, tem merecido grande atenção e elaboração de estratégias de controle (Schmunis, 2007).

Nussenzweig e seus colaboradores, mesmo sem ferramentas para entender todos os mecanismos de ação da violeta de genciana, desenvolveram um estudo que permanecerá como um marco da ciência brasileira. Apesar de ter caído em desuso e de não ter mais sentido usar substâncias a serem adicionadas ao produto sangue antes das transfusões, esses estudos mostraram a importância a ser dada à determinação de doadores chagásicos e ao desenvolvimento de técnicas sorológicas factíveis e de alta sensibilidade para serem utilizadas num cenário em que predomina o rastreamento, como temos na atualidade.

REFERÊNCIAS

BOVERIS, A. & STOPPANI, A. O. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 33: 1.306-1.308, 1977.

CHAGAS, C. R. J. Nova tripanossomiase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n.g., n.sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

DIAS, E. *Um Ensaio de Profilaxia da Moléstia de Chagas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1945.

DIAS, J. C. P. & SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31: 373-383, 1998.

DIAS, J. C. P. & SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 603-612, 2002.

DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on Trypasnosoma cruzi. *Reviews of Infectious Diseases*, 6(2): 223-238, 1984.

DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. The metabolism and mode of action of gentian violet. *Drug Metabolism Reviews*, 22(2-3): 161-178, 1990.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. & CRUZ, F. S. Enhancement of the cytotoxicity of crystal violet against *Trypanosoma cruzi* in the blood by ascorbate. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 27: 241-248, 1988.

DOCAMPO, R. *et al*. Light-enhanced free radical formation and trypanocidal action of gentian violet (crystal violet). *Science*, 220: 1.292-1.295, 1983.

DOCAMPO, R. *et al*. Prevention of Chagas disease resulting from blood transfusion by treatment of blood toxixity and mode of action of gentian violet. *Biomedical and Environmental Sciences*, 1(4): 406-413, 1988.

DOCAMPO, R. *et al*. Disruption of Ca2+ homeostasis in *Trypanosoma cruzi* by crystal violet. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(3): 311-316, 1993.

FAIRLAMB, A. H. & CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*, 46: 695-729, 1992.

FRASCH, A. C. C. & REYES, M. B. Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. *Parasitology Today*, 6: 137-139, 1990.

FREITAS, J. L. P. *et al*. Primeiras verificações da transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Revista Paulista de Medicina*, 40: 36-40, 1952.

GADELHA, F. R. *et al*. The mitochondrion of *Trypanosoma cruzi* is a target of crystal violet toxicity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34(2): 117-126, 1952.

MAZZA, S. *et al*. Transmisión del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. *Mepra*, 28: 41-46, 1936.

MORENO, S. N.; CARNIERI, E. G. & DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by crystal violet. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 67(2): 313-320, 1994.

PELLEGRINO, J. Transmissão da doença de Chagas pela transfusão de sangue: primeiras comprovações sorológicas em doadores e em candidatos a doadores de sangue. *Revista Brasileira de Medicina*, 6: 297-301, 1949.

RESZKA, K.; CRUZ, F. S. & DOCAMPO, R. Photosensitization by the trypanocidal agent crystal violet: type I versus type II reactions. *Chemico-biological Interactions*, 58: 161-172, 1986.

SCHMUNIS, G. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, supl. I: 75-85, 2007.

SILVA, L. H. P. Major advances in research relating to parasitic diseases. *In*: SCIENCE, HEALTH AND DEVELOPMENT: ACHIVEMENTS AND CHALLENGES IN ONE HUNDRED YEARS OF PAHO, 12-14 jun. 2002, Washington.

TEMPERTON, N. J. *et al*. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 96(1-2): 167-176, 1998.

UMEZAWA, E. S. *et al*. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1): 449-452, 2004.

VERGARA, U. *et al*. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(1): 39-43, 1992.

WENDEL, S. A quimioprofilaxia de doenças transmissíveis por transfusão em componentes lábeis hemoterápicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(4): 275-281, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Control of Chagas Disease*. Geneva: World Health Organization, 2002.

FRANCISCO S. LARANJA, EMMANUEL DIAS, GENARD NÓBREGA & ALOISIO MIRANDA

Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study.

Circulation, XIV: 1.035-1.060, 1956.

Francisco da Silva Laranja Filho (1916-1989)

Médico nascido no Rio Grande do Sul, foi diretor do Instituto Oswaldo Cruz e pesquisador do Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas de Bambuí, dedicando-se especialmente às pesquisas em cardiopatia chagásica.

Emmanuel Dias (1908-1962)

Médico nascido no Rio Janeiro, foi diretor do Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas de Bambuí e destacou-se pela realização de importantes investigações científicas sobre a tripanossomíase americana e pelas primeiras ações de controle da doença.

Genard da Cunha Nóbrega (1872-1948)

Médico paraibano do Instituto Oswaldo Cruz, desenvolveu trabalhos sobre clínica e terapêutica da doença de Chagas. Com Laranja, Dias e Miranda, empreendeu uma revisão da forma crônica da moléstia com ênfase na cardiopatia chagásica.

Aloisio Miranda (s.d.)

Com Laranja, Dias e Nóbrega, empreendeu uma revisão clássica da forma crônica da doença de Chagas, enfocando especialmente a cardiopatia chagásica.

Chagas' Disease

A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study

By F. S. Laranja, M.D., E. Dias, M.D., G. Nobrega, M.D., and A. Miranda, M.D.

A study of the most important clinical and pathologic aspects of Chagas' disease has been presented, on the basis of the analysis of 180 cases of acute infection (11 with autopsy), 657 cases of chronic asymptomatic infection, and 683 cases of chronic Chagas' heart disease (21 autopsied cases with *Schizotrypanum cruzi* in myocardium).

CONSIDERABLE advances in the clinical aspects of Chagas' disease have been made in the last decade. In the historical review of our knowledge 3 periods may be recognized.[15] 1. The first period began with the clinical descriptions made by Chagas.[2, 3] He described an acute form[4] and several chronic forms[3, 5] of American trypanosomiasis. He was greatly impressed[6, 7] by the cardiac disturbances exhibited by many persons from the region in which the disease was discovered and claimed that such cardiac disturbances were related to chronic American trypanosomiasis.

2. From 1913 to 1943 acute cases of Chagas' disease were described in 15 American countries. Various authorities doubted an etiologic relationship between *Schizotrypanum cruzi* (*Trypanosoma cruzi*) infection and the chronic forms described by Chagas; only a few cases of chronic Chagas' disease were reported up to 1945. The concept of Chagas' disease as an uncommon acute disease was generally accepted. The true medical and social importance of this endemic infection was not appreciated.

3. Carlos Chagas' original observations on the cardiac disturbances in chronic *S. cruzi* infection have been confirmed and considerably extended[10-18] in the last 10 years. Epidemiologic studies, observations of the clinical manifestations, the description of the electrocardiographic changes, improved laboratory diagnosis, the pathologic studies, and, finally, the production of a chronic type of heart disease similar to the human in dogs experimentally infected with *S. cruzi*—all these studies have provided a firm basis for defining chronic Chagas' heart disease as a distinct clinicoanatomic entity.[17]

Observations have shown the common occurrence in some Brazilian districts of both cardiospasm (megaesophagus) and chronic trypanosomiasis. Patients from such areas with cardiospasm show a particularly high percentage (up to 97 per cent) of positive complement-fixation tests for Chagas' disease and electrocardiographic changes similar to those usually found in chronic Chagas' heart disease.[19, 23] These facts suggest a possible etiologic relationship between Chagas' disease and cardiospasm in those areas. The subject requires further investigation.

Etiology

S. cruzi has a typical trypanosome blood form, characterized by a large, terminal or subterminal blepharoplast. In the tissues the flagellates undergo regressive changes resulting in the formation of leishmaniform organisms that divide by binary fission, thus forming intracellular colonies of parasites. The myocardial fibers seem to be the most important site of multiplication of *S. cruzi*.

In sections from the myocardium the parasite usually assumes the morphology of leishmania bodies (fig. 1*a*), which are round corpuscles measuring 4 by 2 or 3 by 1.5 microns, containing an ovoid nucleus and a rodlike blepharoplast. The fibers occasionally contain flagellate or preflagellate forms (fig. 1*b*) of *S. cruzi*; in this case the morphology of individual microorganisms usually is not clearly seen in

From the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

This work was supported in part by the Conselho Nacional de Pesquisas.

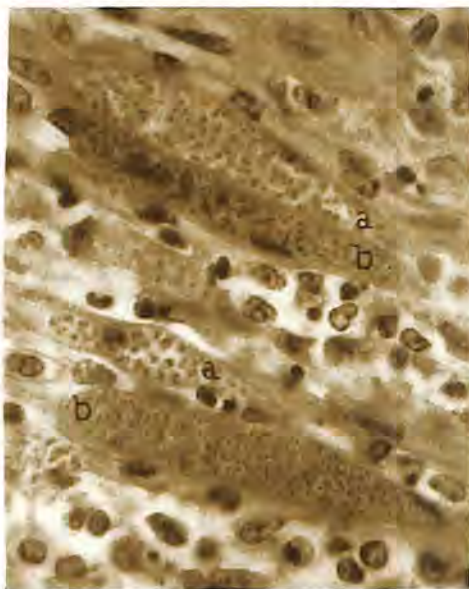



FIG. 1. Leishmanial forms (*a*) and preflagellate forms (*b*) of *S. cruzi* in the myocardial fibers. Dog. no. 35. Experimental infection. Death on the thirty-sixth day of disease, with pronounced cardiac dilatation, right bundle-branch block, atrial fibrillation, and congestive heart failure.

FIG. 2. Areas in which triatomid bugs infected with *S. cruzi* have been found. Data collected from the literature up to 1954.

tissue sections. Care should be taken in distinguishing such forms from other intracellular parasites, especially Toxoplasma.

S. cruzi is virulent to man and several animals and is easily cultivated in vitro. Its virulence is variable, depending on the source of the strain and on other factors. The blood trypanosome form is picked up by the insect vector.

EPIDEMIOLOGY, GEOGRAPHIC DISTRIBUTION, AND INCIDENCE

The insect vectors of *S. cruzi* are Hemiptera belonging to the family Reduviidae, subfamily Triatominae. The most important species belong to the genera Triatoma, Panstrongylus, and Rhodnius. More than 30 species of triatomid bugs have been found infected with *S. cruzi*.[8] *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, and *Rhodnius prolixus* are the principal vectors of Chagas' disease in large areas of South and Central America.

Infected triatomid bugs are widely distributed in this continent, from the United States to Argentina (fig. 2). *S. cruzi* has never been detected in triatomes outside the American continent, although it was found in monkeys in Java (Malamos).

Triatominae are strictly hematophagous insects and they get their flagellates from the blood of vertebrate hosts; so, the presence of infected bugs depends upon the existence of infected vertebrates. To the species well adapted to human dwellings, such as *T. infestans*, *P. megistus*, and *R. prolixus*, man and domestic animals are the main sources of infection.

In rural and semirural areas of the Latin American countries there are huge regions infested with domestic triatomid bugs. The primitive mud huts covered with thatched roofs are favorable habitats for such species. The vectors live in hiding places, in holes and cracks in the walls, in beds, behind trunks, pictures, etc. In the United States there are

several species infected with *S. cruzi*, but they seldom breed in homes, although these are frequently invaded by flying insects during the summertime.

The triatomid bugs harbor *S. cruzi* in their digestive tract and apparently they suffer no harm as a result of being infected with the flagellate. Cyclical development of the parasite takes place in the stomach, duodenum, and rectum of the bugs. The blood trypanosome forms pass through the crithidial (multiplication) stage, and give rise to the metacyclical (infective) forms, which are eliminated with the excreta of the insects. Normally, transmission of the disease is effected through contamination of mucosa or skin with infected dejections eliminated by the bugs during or soon after feeding. Transmission of Chagas' disease to man by blood transfusion, or via placenta, or accidentally by inoculation of blood from infected animals, may occur.

Human infection with *S. cruzi* has been detected so far in all countries over a region extending from the United States (Texas) to Argentina, with the exception of Honduras and British and Dutch Guianas. In the last 10 years a large number of cases of chronic Chagas' heart disease has been diagnosed, particularly in Brazil and Argentina. In some areas of the Brazilian States of Minas Gerais, São Paulo, and Bahia, *S. cruzi* infection is evidently one of the most common etiologic factors of chronic heart disease. Nevertheless, the geographic distribution and incidence of human infection with *S. cruzi* as well as the incidence and severity of chronic Chagas' heart disease in different endemic areas are incompletely known. In most of the huge rural and semirural areas in which infected triatomid bugs have been found, no adequate diagnostic surveys for human cases of Chagas' disease have yet been carried out. There is still a great deal of work to be done, before we shall be able to appreciate the significance of Chagas' disease to the countries of the American Continent.

Acute Chagas' Disease

Acute infection may occur at any age, but usually occurs in the first years of life (fig. 3).

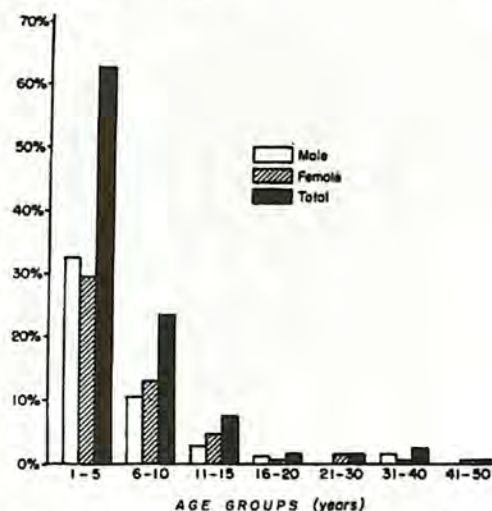



Fig. 3. Age and sex distribution of 171 cases of acute Chagas' disease.

Acute cases are more frequent in the summer months. The clinical picture may be quite easily recognized in endemic areas. The acute period is manifested by general malaise, fever, abundant sweating, muscular pains, irritation, anorexia, and sometimes vomiting and diarrhea; local signs of portal of entry of the parasite in the organism, lymph node enlargement, generalized edema, and in some cases anasarca; hepatomegaly and moderate splenomegaly, and occasionally cutaneous eruptions (schizotrypanides); symptoms and signs of heart involvement, and in some cases (usually fatal) symptoms and signs of central nervous system involvement (acute meningoencephalitis). Laboratory findings include leukocytosis with pronounced lymphocytosis, increased blood sedimentation rate, widening of the coagulation band on Weltman's reaction, decrease in serum albumin fraction, and frequently increase of certain globulin fractions of blood sera during the edematous period, as well as abnormalities of some other liver function tests.

Cardiac Involvement

Cardiac involvement of greater or lesser intensity probably occurs in almost every case of acute Chagas' disease, but is frequently not recognized. A review of the 19 cases of acute Chagas' disease so far reported with post-

TABLE 1.—*Clinicopathologic Findings in Eleven Cases of Acute Chagas' Disease*

Case, reg. no.	Age and sex	Duration of disease (approxim.)	Death	X-ray of chest	Electrocardiogram	Chief anatomic findings:*	
						Heart	Other organs
1 429 J.S.	2 mos. M	10 days	Broncho-pneumonia, pyothorax	Normal cardiac area	Rate: 180; AQRS: approx. +95° AT +35° QT 0.20″	Acute, moderately intense (++), myocarditis, preponderant in subepicardial areas left ventricle; slight degenerative changes of myocardial fibers; edema intima and media of small arteries of right ventricle; numerous myocardial fibers parasited with *S. cruzi*	Bronchopneumonia and fibrinopurulent pleuritis at right side, right pyothorax; fatty degeneration liver
2 519 C.M.S.	5 mos. F	2 mos.	Cardiac failure	—	(Made 7 days before death) Rate: 170 P-R: 0.12″ AQRS: +80° AT +5°	Acute, severe (++++) myocarditis, preponderantly subendocardial and more severe at ventricles; slight degenerative changes of myocardial fibers; *S. cruzi* in myocardial fibers	Passive congestion lungs, liver, and kidneys
3 589 D.S.	7 yrs. F	2 mos.	Cardiac failure, convulsions	—	—	Acute, diffuse myocarditis of slight (+) intensity with disseminated degenerative changes of myocardial fibers; slight degree of fibrosis of left ventricle; *S. cruzi* within myocardial fibers	Passive congestion lungs, liver, and kidneys; fat degeneration of liver
4 588 F.D.	2 yrs. F	3½ mos.	Cachexia	Moderate enlargement of cardiac shadow (pericardial fluid) until 2 weeks before death	Abnormal: Rate: 150. PR 0.16″. Low voltage of QRS in extremity leads. Prolonged Q-T interval. Subendocardial injury pattern	Acute, diffuse, moderately intense (++) myocarditis with slight degenerative changes of myocardial fibers; slight degree of fibrosis of left ventricle; *S. cruzi* within myocardial fibers	Fat degeneration liver and kidneys
5 408 G.M.S.	5 yrs. F	22 days	Convulsions, congestive heart failure	—	Abnormal: Rate: 130. Prolongation of P-R interval. Complete RBBB. Pattern of subendocardial injury, followed by subepicardial injury of anterior wall	Acute, very severe (+++++) diffuse myocarditis, predominantly subendocardial and on the basal portion of the ventricles; severe, disseminated, hyaline degeneration of myocardial fibers; Heavy parasitism of myocardial fibers by *S. cruzi*; Extensive lesions involving all the portions of the His-Tawara system, and apparently more severe in initial portion of right bundle of His	Chagasic encephalitis; tuberculosis bronchial and hilar lymph nodes; serous hepatitis; anasarca (bilateral hydrothorax, hydropericardium, and hydroperitoneum); passive congestion of lungs, spleen, kidneys, and adrenal glands

6 252 A.S.	2 yrs. M	3 mos.	Convulsions	Normal cardiac area (27 days before death)	Abnormal: Rate: 136. QRS 0.07″. AQRS approx. +135°. AT approx. +90°. T wave neg. in V_1, pos. in V_2 and diphasic −+ in V_5, V_6.	Acute, severe (+++) diffuse myocarditis, with moderately severe degenerative changes of myocardial fibers and interstitial fibrosis; lesions were more severe in ventricles, particularly left; circumscribed pericarditis; *S. cruzi* in myocardial fibers	Passive congestion lungs, liver, kidneys, and spleen
7 295 J.B.	4 yrs. M	6 mos.	Congestive heart failure	—	Abnormal: Rate: 185. Prolongation of P-R interval. Low voltage of QRS and T waves. AQRS +110°. AT +10°.	Acute, diffuse myocarditis of slight (+) intensity, with slight degree of degenerative changes of myocardial fibers and conspicuous interstitial fibrosis of myocardium; circumscribed acute pericarditis; area of fibrous thickening of endocardium at base of left ventricle; *S. cruzi* in myocardium	Edema and hyperemia of lungs; bronchopneumonia; pulmonary infarction; fat degeneration of liver
8 270 J.C.	2 yrs. M	6 mos.	Congestive heart failure	—	Abnormal: Rate: 140. Low voltage QRS extremity and precordial leads. AQRS +90°. Low T waves in standard leads, neg. in V_1, V_2, V_3, diphasic −+ in V_4, isoelectric in V_5	Acute, severe (+++), diffuse and focal myocarditis with slight degree of degenerative changes of myocardial fibers; moderate interstitial fibrosis; various myocardial fibers, particularly in left ventricle, parasited with *S. cruzi*; conspicuous reduction of lumen of anterior descending coronary artery by atheromatous (?) plaque	Passive congestion of lungs, liver, spleen, and kidneys
9 1650 E.L.E.	10 mos. M	20 days	Convulsions	—	Abnormal: Rate: 150. Low voltage of P waves and QRS complex in extremity leads. QRS 0.06″. AQRS approx. −170°. AT approx. +45°. Incomplete RBBB?	Acute, diffuse, moderately severe (+++) myocarditis, with degenerative changes of myocardial fibers; various myocardial fibers with *S. cruzi*. Edema of intima of anterior coronary artery	Chagasic encephalitis; passive congestion of lungs, liver, and spleen; fat degeneration of liver
10 2284 J.T.M.	2 yrs. 6 mos. M	2 mos.	Congestive heart failure	—	Abnormal: Low voltage of QRS in extremity leads; left axis deviation	Acute very severe (+++++), focal and diffuse myocarditis with relatively few *S. cruzi* in myocardial fibers; acute pericarditis over basal portion of left ventricle	Passive congestion of lungs, liver, spleen, and kidneys; fat degeneration of liver; lymphoid hyperplasia of spleen
11 1500 Ub C.S.	15 mos. F	40 days	Congestive heart failure	—	—	Acute, very severe (+++++), diffuse myocarditis with many myocardial fibers parasited with *S. cruzi*; circumscribed acute pericarditis at base of right ventricle	Passive congestion lungs, liver, and spleen; fat degeneration of liver.

* In cases 5 and 6 autopsy was performed by Dr. Torres and Dr. Duarte, Division of Pathology, Instituto Oswaldo Cruz; in the remaining cases only the heart and fragments of some organs were available for microscopic examination.

mortem examination leaves the impression that in most if not in all these cases, the heart lesions were essentially autopsy findings whose full clinical importance would hardly be appreciated during life. An acute, severe, diffuse myocarditis with leishmanial forms of *S. cruzi* in myocardial fibers was present in all the 19 autopsy cases from the literature, and in most of them there were also abundant pericardial transudate and signs of passive congestion in various organs. Specific inflammatory lesions of the central nervous system (acute meningoencephalitis) were also found in several of these 19 cases.

In our own series of 11 autopsy cases of acute Chagas' disease from Bambuí (table 1) the chief anatomic findings were similar to those of the 19 previously reported cases: acute myocarditis (fig. 4) with *S. cruzi* in myocardial fibers in all the 11 cases; anatomic evidences of circulatory failure in 8 cases; chagasic encephalitis in 2 cases (the nervous system was not examined in the remaining cases); pronounced fatty degeneration of the liver in 7 cases.

With the exception of the frequency and severity of the heart lesions, the manifestations of acute Chagas' heart disease do not differ essentially from those due to acute myocarditis of other etiologies.

In severe cases the picture of bilateral heart failure (pulmonary and systemic congestion, bilateral increase of cardiac shadow, regular heart rhythm, accelerated heart rate, gallop

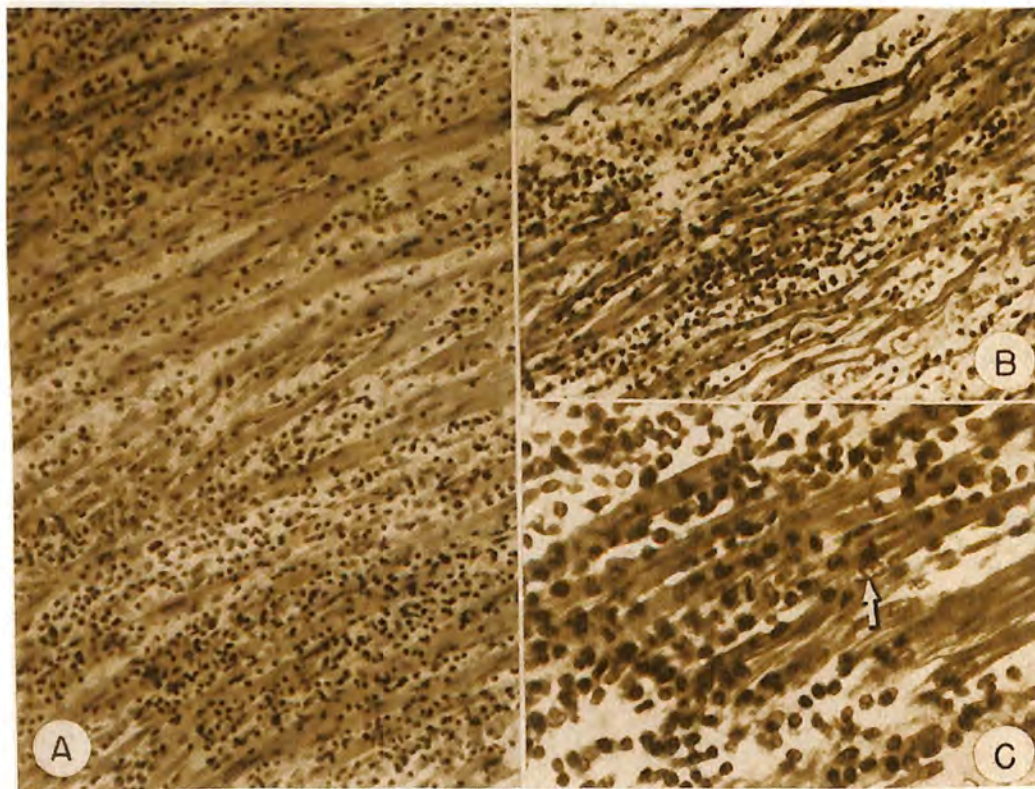



FIG. 4. Acute myocarditis: *A*. Case no. 11 (table 1). Patient aged 15 months. Acute myocarditis of approximately 40 days' duration. The muscle fibers are separated by a diffuse infiltration of mononuclear cells (H & E × 200). *B*. Case no. 8 (table 1). Patient aged 2 years. Myocarditis of approximately 6 months' duration. Diffuse inflammatory infiltration, loss of muscle substance and some degree of proliferation of the interstitial connective tissue (H & E × 220). *C*. Same patient as in *B*. The cellular exudate consists of lymphocytes, monocytoid cells, and histiocytes. One myocardial fiber is seen (arrow) with leishmanial forms of *S. cruzi* (H & E × 440).

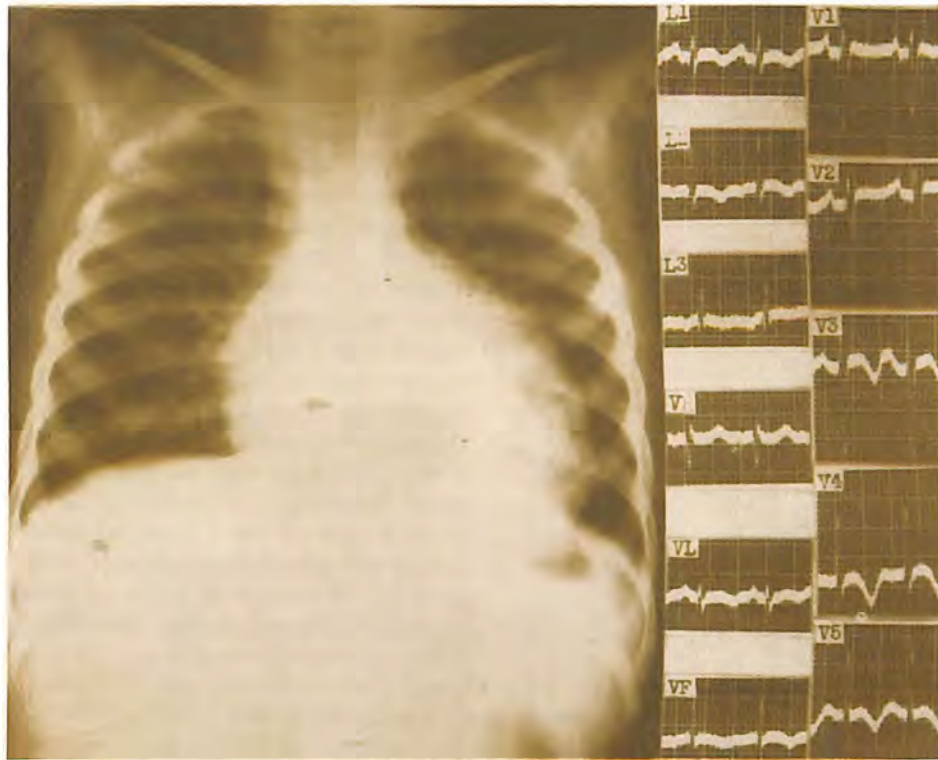



FIG. 5. Acute Chagas' heart disease. Case no. 1833. Marked enlargement of the cardiac shadow, particularly to the left, in the sixth week of infection. Primary T-wave changes. The cardiac shadow and the electrocardiogram reverted to normal at the fourth month of infection.

rhythm or embryocardia (tic-tac rhythm), decreased systolic and low pulse pressure with small radial pulse) allows the clinical diagnosis of myocarditis to be made without difficulty. The convulsive syndrome frequently exhibited by children with severe forms of the disease may be in some cases related to acute circulatory failure.

In mild cases detection of the acute myocarditis by physical examination is less acurate; gallop rhythm with diminution of the intensity of the first heart sound (delayed A-V conduction time) and signs of cardiac dilatation may be the only reliable physical signs of myocardial involvement. Serial x-ray examination of the chest and electrocardiography are the most accurate methods for detecting acute Chagas' heart disease. Enlargement of the cardiac shadow is present in the majority of patients with acute Chagas' disease. It is diffuse and may be moderate or pronounced (fig. 5). The form and the variations in the size of the cardiac shadow suggest that pericardial effusion is often an important factor in the increased cardiac shadow.[13] Usually the cardiac silhouette returns to normal earlier than the electrocardiogram.

Electrocardiographic abnormalities were present in 78 (43.3 per cent) of a group of 180 (159 nonfatal and 21 fatal) patients with acute Chagas' disease. The most common electrocardiographic changes in the entire group of cases of acute Chagas' disease (table 2) were prolongation of P-R interval, primary T-wave changes, low voltage of QRS, prolongation of Q-T interval, and associated ST-T changes ("injury-ischemia pattern").

Comparing the findings in the nonfatal (159 cases) and in the fatal group (21 cases, 11 with postmortem examination) of patients (table 2) the following observations may be made.

TABLE 2.—*Electrocardiographic Changes in 180 Patients (159 Nonfatal and 21 Fatal) with Acute Chagas' Disease*

	Nonfatal: 159 patients		Fatal: 21 patients		Total: 180 patients	
	No. of cases*	%	No. of cases*	%	No. of cases*	%
Abnormal electrocardiogram	60	37.7	18	85.7	78	43.3
Prolongation of P-R	32	20.1	7	33.3	39	21.7
Primary T-wave changes	28	17.6	7	33.3	35	19.4
Prolongation of Q-T interval	12	7.5	1	4.7	13	7.2
ST-T changes (injury-ischemia pattern)	4	2.5	4	19.0	8	4.4
Low voltage of QRS	7	4.4	8	38.1	15	8.3
P-wave abnormalities	4	2.5	1	4.8	5	2.8
Ventricular extrasystoles	3	1.9	1	4.8	4	2.2
Nodal rhythm	1	0.6	—		1	0.5
RBBB, complete			2	9.5	2	1.1

* Two or more types of electrocardiographic changes were frequently present in the same patient.

1. Myocardial damage was detected by the electrocardiogram in a high (85.7 per cent) percentage of cases from the fatal group. In the nonfatal group only 37.7 per cent showed electrocardiographic abnormalities.

2. Prolongation of P-R interval and primary T wave changes were frequent in the nonfatal group, but had a significantly higher (33.3 per cent) incidence in the fatal group.

3. S-T displacements associated with T-wave changes ("injury-ischemia") and low voltage of QRS were uncommon in the nonfatal and had a significantly high incidence in the fatal group.

4. The only 2 cases of intraventricular block (right bundle-branch block) were in the fatal group.

A comparison of tables 2 and 3 calls attention to the marked differences in the type and incidence of electrocardiographic abnormalities in acute and chronic Chagas' heart disease. Also from the clinical and pathologic standpoints, acute and chronic Chagas' heart disease each have quite distinctive features. As a matter of fact, these 2 types of heart disease seem to have in common only the etiologic agent and a widespread inflammatory process of the myocardium.

The diffuse myocardial lesions in acute Chagas' disease tend to alter the ventricular complex and cause only minor degrees of A-V conduction disturbances. They are usually not apt to produce marked conduction disturbances nor to set up frequent ectopic contractions. Electrocardiographic-anatomic correlations in our human and experimental material indicate that the spread of excitation to the atria and ventricles is apparently not significantly disturbed despite the severe, diffuse, acute inflammatory myocardial lesions; only when dilatation of heart cavities or proliferation of interstitial connective tissue takes place do significant conduction disturbances appear. The appearance of intraventricular block (right bundle-branch block) in acute Chagas' heart disease carries a poor prognosis; in our human and experimental material this disturbance occurred only in cases of severe myocardial lesions and cardiac dilatation. A quite different prognostic significance is attached to right bundle-branch block in chronic Chagas' heart disease; in this condition the conduction disturbance may be found in cases showing only limited cicatricial inflammatory myocardial lesions without cardiac enlargement, and may be compatible with long survival of the patient.

Diagnosis

Laboratory diagnosis of acute Chagas' disease is based on the demonstration of the parasite. In the first weeks of infection the high level of parasitemia permits demonstration of circulating forms (trypanosomes) of *S. cruzi* in a fresh blood smear or a thick drop preparation of blood. As the infection evolves, the number of blood circulating trypanosomes decreases; after the sixth to tenth weeks of infection direct microscopic demonstration of the parasite in the blood is difficult. At this time, xenodiagnosis,* animal inoculation of blood, or blood culture are the recommended procedures for demonstration of the parasite. A precipitin reaction proposed by Muniz and

* A diagnostic method proposed by Brumpt, consisting in feeding uninfected laboratory-bred triatomid bugs on patients and examining the bugs' feces for the presence of *S. cruzi* 2 to 3 months after feeding.

TABLE 3.—*Electrocardiographic Changes in 683 Patients with Chronic Chagas' Heart Disease (Including 200 Fatal Cases)*

	Non fatal: 483 patients		Fatal: 200 patients		Total: 683 patients	
	No. of cases*	%	No. of cases*	%	No. of cases*	%
Atrial-ventricular block	174	36.0	74	37.0	248	36.3
First degree A-V block	138	28.6	30	15.0	168	24.6
Second degree A-V block	14	2.9	10	5.0	24	3.5
Complete A-V block	22	4.5	34	17.0	56	8.2
right BBB type of QRS	14	2.9	27	13.5	41	6.0
left BBB type of QRS	2	0.4	—		2	0.3
indeterminate BBB type of QRS	3	0.6	1	0.5	4	0.6
right and left BBB type of QRS	1	0.2	6	3.0	7	1.0
normal duration of QRS	2	0.4	—		2	0.3
Intraventricular block	254	52.6	128	64.0	382	55.9
Complete RBBB	226	46.8	104	52.0	330	48.3
type:						
concordant	43	8.9	23	11.5	66	9.7
S-wide	128	26.5	29	14.5	157	23.0
discordant	44	9.1	26	13.0	70	10.2
"atypical"	11	2.3	26	13.0	37	5.4
associated with QRS changes in lead I or left precordial leads						
Slurring of R; delayed intrinsicoid deflection	6	1.2	21	10.5	27	3.9
Signs of left ventricular enlargement	2	0.4	8	4.0	10	1.5
Signs of necrosis of anterior wall	6	1.2	25	12.5	31	4.5
associated with ST or T wave changes	27	5.6	39	19.5	66	9.7
Incomlplete RBBB (nonisolated)	18	3.7	4	2.0	22	3.2
Compete LBBB	6	1.2	9	4.5	15	2.2
Incomplete LBBB	4	0.8	11	5.5	15	2.2
QRS-T changes without intraventricular block						
Signs of left ventricular enlargement	11	2.2	13	6.5	24	3.5
Isolated QRS changes	33	6.8	29	14.5	62	9.1
Primary ST-T changes	62	12.8	26	13.0	88	12.9
Abnormalities of P wave	27	5.6	46	23.0	73	10.7
Premature contractions	166	34.4	161	80.5	327	47.9
Supraventricular	11	2.3	8	4.0	19	2.8
Ventricular	153	31.7	138	69.0	291	42.6
Extrasystolic ventricular tachycardia	2	0.4	15	7.5	17	2.5
Paroxysmal tachycardia	3	0.6	13	6.5	16	2.3
Supraventricular	1	0.2	1	0.5	2	0.3
Ventricular	2	0.4	12	6.0	14	2.0
Atrial fibrillation or flutter	13	2.7	32	16.0	45	6.6
Nodal rhythm. Isorhythmic A-V dissociation	2	0.4	4	2.0	6	0.9

* Two or more types of electrocardiographic changes were frequently present in the same patient.

Freitas[24] has shown consistently positive results in our acute cases. Complement-fixation test (Guerreiro-Machado's reaction) may yield negative results in the early stages of acute infection; it is a valuable procedure for the diagnosis of chronic Chagas' disease.

Mortality

Mortality during the acute period of Chagas' disease in 235 cases from Bambuí reached 9.4 per cent (22 cases). Death is due to congestive heart failure, convulsive seizures, or to associated infection. The acute infection is more severe in early infancy; in adolescents and adults it is rarely fatal.

Chagas' disease has a protracted course. The acute period gradually passes over into the chronic stage of the disease.[13] The acute manifestations subside, but the patient remains infected, possibly for the rest of his life. In endemic areas, patients are subject to repeated reinfections. It is not known whether or not such reinfections play any role in the course of the disease. We know that patients kept away from endemic areas for many years remain infected and that the chronic heart involvement may progress.

In most cases the manifestations of acute Chagas' heart disease disappear in a few months or years.[11-13] Some patients may show residual electrocardiographic abnormalities. From a group of 72 cases of acute Chagas' heart disease, followed from 4 to 10 years (average: 7 years, 5 months) in Bambuí, 11 patients (15.3 per cent) showed electrocardiographic abnormalities (9 with prolongation of P-R). It seems probable that such electrocardiographic changes represent active myocarditis (in 1 patient incomplete right bundle-branch block changed to complete right bundle-branch block) but no anatomic studies are as yet available from this group of cases.

Asymptomatic Period of Chronic Infection

Subsidence of the clinical manifestations and reduction of the number of trypanosomes in the blood to such levels that they can no longer be seen on direct fresh examination are the usual criteria for distinguishing the acute from the chronic stages of the disease.

The asymptomatic period, described[13] as the chronic indeterminate form of the disease, comprises a long period, usually from 10 to 20 years, between the end of the acute stage and the establishment of the late heart disease of chronic infection. Patients during the asymptomatic period may be considered as belonging to the category of potential cardiac disease.

In the first years following the acute infection, these patients show some degree of enlargement of the superficial lymph nodes, occasionally moderate enlargement of the liver, as well as periods of slight, irregular elevations of temperature, increased blood sedimentation rate, and moderate lymphocytosis. In other cases the infection seems to remain mostly inactive for long periods of time.

Transition from the asymptomatic phase to the stages of heart disease in chronic infection is sometimes difficult to define clearly, since many patients develop transient electrocardiographic changes long before the appearance of the permanent cardiac manifestations of chronic Chagas' heart disease. From a group of 75 patients with a known acute period of infection (40 with normal electrocardiogram), 17 (22.7 per cent) developed electrocardiographic abnormalities during an average observation period of 10 years after the acute infection; the electrocardiographic changes were transient in 5 and permanent in 12.

In the endemic areas this group of asymptomatic chronic infection is the largest of the 3 groups of patients with *S. cruzi* infection. Although these patients are apparently healthy and asymptomatic, they are most important from the epidemiologic standpoint.

Age and Sex

There was no significant variation in the incidence of chronic infection according to sex in the entire group of 1,340 patients (males 650, females 690). Two thirds of the cases were between 11 and 40 years of age; 83.5 per cent were between 11 and 50 years (fig. 6). A significant preponderance of females (60.1 per cent) was observed in a group of 657 patients (females 390, males 267) (fig. 7) in the chronic asymptomatic stage of infection. In this group 83.6 per cent of the patients were in the

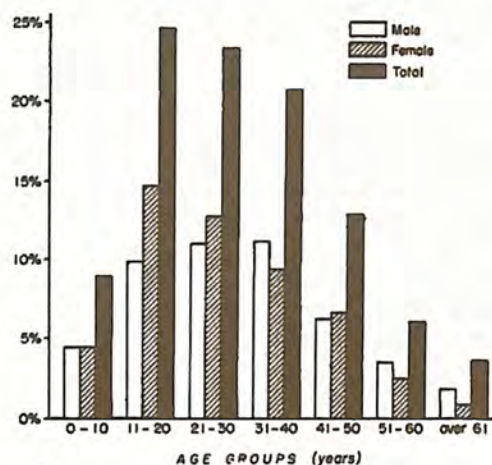
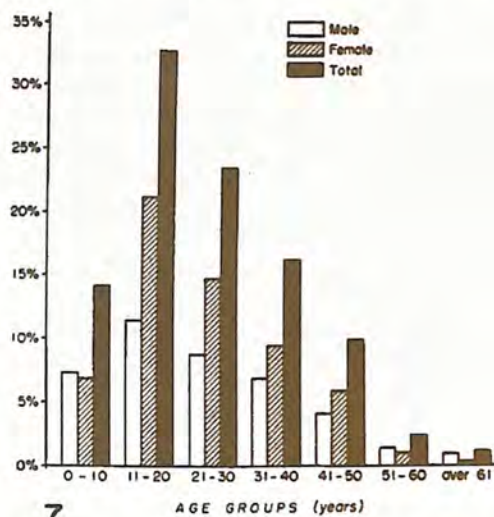
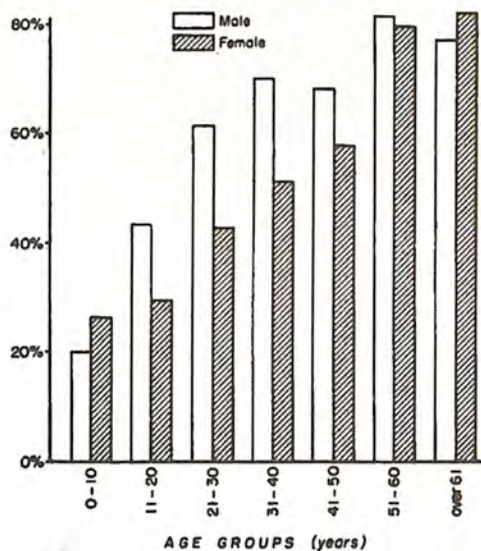
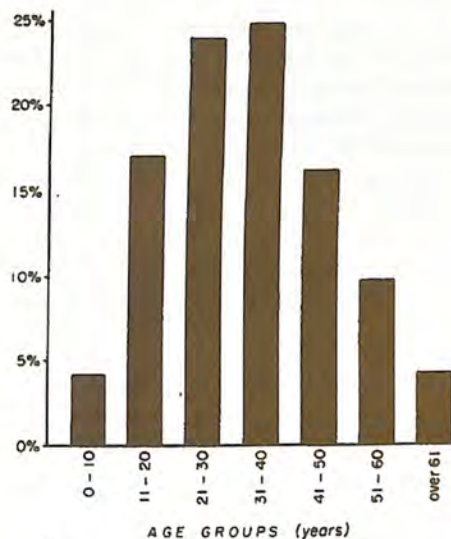



FIG. 6. Age and sex distribution of 1,340 cases of chronic *S. cruzi* infection (683 with heart involvement and 657 without evidences of heart disease).

FIG. 7. Age and sex distribution of 657 cases of chronic *S. cruzi* infection without evidences of heart involvement.

FIG. 8. Incidence of heart involvement according to sex in different age groups of 1,340 patients with chronic *S. cruzi* infection.

FIG. 9. Age distribution of 683 cases of chronic Chagas' heart disease.

age groups from 11 to 50 years, the highest number of cases (51.2 per cent) being between 11 and 30 years of age.

CHRONIC CHAGAS' HEART DISEASE

From a medical point of view it may be stated that a clinical diagnosis of chronic *S. cruzi* infection in man rests on the recognition of chronic Chagas' heart disease.

Incidence

During the period 1943–1955, approximately 2,100 chronic and 280 acute cases of Chagas' disease were diagnosed in Bambuí, Minas

Gerais. From the group of 1,340 chronic cases in which electrocardiograms were recorded, 683 (50.9 per cent) patients showed evidences of myocardial damage. Since 1945, when we reported[10] our first cases, up to the present time approximately one half of the patients with chronic *S. cruzi* infection showed evidence of heart damage. The sample is not an unselected one, for many cardiac patients seek medical care in our Department. A survey made[18] in the unselected population from 5 to 60 years of age in the same endemic area disclosed an incidence of 32.7 per cent of chronic heart damage in the group with chronic *S. cruzi* infection. Many cases of severe chronic Chagas' heart disease have been reported recently by various authors from the States of Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Goiás, and Pernambuco, as well as from Argentina, Venezuela, and Educador. Variations seem to occur in the incidence and severity of myocardial damage in chronically infected patients from different endemic areas.[13-15]

Age and Sex

A progressive increase in incidence of heart involvement in different age groups of 1,340 patients with chronic *S. cruzi* infection was observed (fig. 8).

In this same group of patients, heart damage showed variations in its incidence according to sex in the different age groups (fig. 8): the males were preponderant in the age groups 11 to 50 and the females were slightly preponderant in the age groups up to 10 and over 61 years of age.

In the group of 683 cardiac patients, 383 (56 per cent) were males and 300 (44 per cent) were females.

Figure 9 shows that 82 per cent of the patients with chronic Chagas' heart disease are in the age groups from 11 to 50 years and that two thirds of these cases are between 11 and 40 years of age. There are a few cases under 10 and over 50 years of age.

From figures 3, 7, and 9 it will be observed that acute infection occurs in the first decade, the chronic asymptomatic cases are preponderant in the second and third decades, and that chronic Chagas' heart disease has its highest incidence in the third and fourth decades of life.

Symptoms and Signs

The manifestations of chronic Chagas' heart disease depend mainly on the severity of the myocardial lesions, on the presence of heart failure, and on the type of arrhythmia.

In the early stages of chronic myocardial damage the patient may have no symptoms and the cardiac shadow may be normal or only slightly enlarged. In such patients, who are usually in the first or second decades of life, the diagnosis of the heart disease rests mainly on the electrocardiographic abnormalities.[10] Even severe heart disease, manifested by cardiac enlargement and advanced degrees of A-V or intraventricular block or other electrocardiographic abnormalities, may be unaccompanied by symptoms. One is impressed in some cases by the scarcity of subjective manifestations in contrast with the severity of the objective signs of advanced heart disease.

Cardiac failure usually assumes the type of right and left ventricular failure, with pronounced systemic congestion. A predominantly right-sided type of heart failure with functional tricuspid regurgitation is frequently observed in patients with advanced congestive failure. Isolated left ventricular failure may be present, however, in the early stages of heart failure.

Physical examination shows irregularities of cardiac rhythm usually due to ventricular premature contractions or A-V block, signs of enlargement of the heart (due mainly to dilatation), and evidences of passive congestion (usually more pronounced in the systemic circulation).

Reduplication of the second pulmonic sound is commonly heard. Gallop rhythm, a muffled first heart sound at the mitral area, and systolic murmurs due to functional mitral or tricuspid regurgitation may be present in patients with congestive heart failure. Marked increase of systemic venous pressure and pronounced enlargement of the liver with occasional pulsation are usual findings in these patients. Systolic blood pressure is normal or, more commonly, moderately lowered, and the

pulse pressure is usually reduced; the radial pulse is small and irregular.

Roentgenography

X-ray pictures of the chest show moderate to pronounced, diffuse enlargement of the cardiac shadow and evidences of passive congestion in the lungs. Pulmonary congestion in many cases is not marked. Clear pulmonary fields together with marked bilateral enlargement of the heart shadow (fig. 10) is a common finding in the chest x-ray of patients with advanced chronic Chagas' heart disease.

Electrocardiography

Recent advances in the knowledge of Chagas' heart disease are due mostly to the electrocardiographic studies during the last decade. The diagnostic value and several peculiar features of the electrocardiographic findings in chronic Chagas' heart disease have been established[10, 12, 13] on the basis of analysis of data from comparatively large groups of patients. These findings have been extensively confirmed by various authors in studies of cases from different endemic areas.

The electrocardiographic abnormalities in a group of 683 patients with chronic Chagas' heart disease (table 3), from Bambuí, are similar to our previous findings. A great variety of electrocardiographic abnormalities are observed. Complete right bundle-branch block, partial and complete A-V block, ventricular premature contractions, QRS abnormalities or primary T-wave changes, and abnormalities of P waves were common findings. Two or more of these abnormalities were found in the same patient in approximately one third of the cases. On the other hand, ectopic atrial rhythms or contractions, complete left bundle-branch block, high voltage of QRS with or without secondary ST-T changes, and marked ST displacements (injury) were unusual findings. Only a small percentage of cases of advanced chronic Chagas' heart disease failed to show conduction disturbances or ventricular premature contractions.

A-V Block. A-V block was present in 36.3 per cent of the cases. Mild A-V block was more common (28.6 per cent) in the nonfatal than

FIG. 10. Case no. 2 (table 4). Patient aged 15. Marked, bilateral enlargement of cardiac shadow in chronic Chagas' heart disease. Clear pulmonary fields.

in the fatal (15.0 per cent) group of cases. First degree A-V block occurs chiefly in the early stages of chronic Chagas' heart diesease,[13] being observed preponderantly in the younger age groups: 72.4 per cent of the cases from the nonfatal group were under 30 years of age. It was the most common (55.2 per cent of the cases) electrocardiographic abnormality present in the age group 11 to 20 years in the 483 nonfatal cases. Intravenous administration of 1 mg. of atropine sulfate may temporarily restore the A-V conduction time to normal; ocular compression may increase the degree of A-V block, with appearance of dropped ventricular beats in patients in the younger age groups.

Chronic *S. cruzi* infection was by far the most common cause of advanced A-V block in patients under 50 years of age in the endemic area that we studied. A comparatively high incidence of advanced A-V block was observed in chronic Chagas' heart disease[10]: second degree A-V block occurred in 3.5 per cent and complete A-V block in 8.2 per cent of the cases from the entire group of 683 patients with chronic Chagas' heart disease. A particularly high incidence (17 per cent) of complete A-V block was found in the group of 200 fatal cases. Ninety per cent of the cases of complete A-V block from this group were 21 to 50 years of

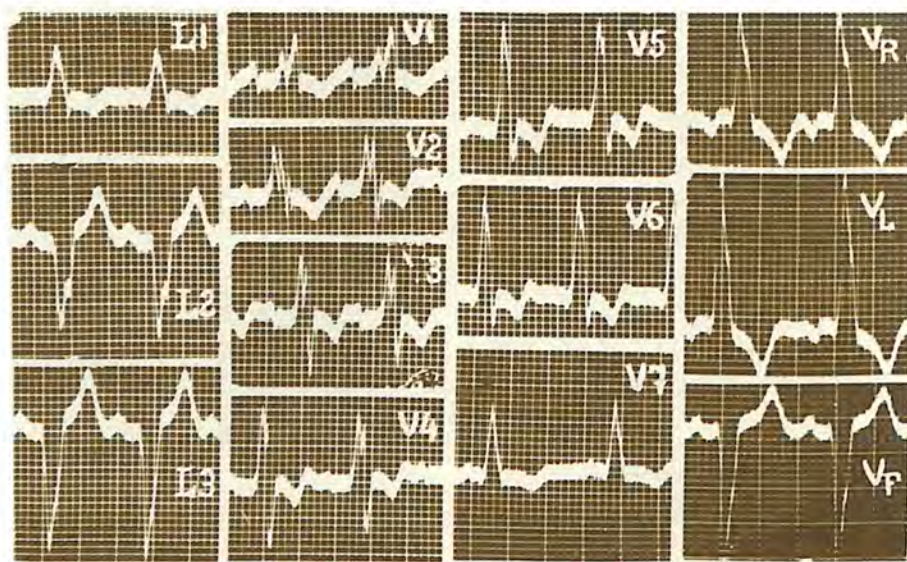



FIG. 11. Atypical type of right bundle-branch block, with slurred QRS and delayed intrinsicoid deflection in left precordial leads. From Dias and associates.[10] Case no. 247. Aged 60. Aortic and coronary atherosclerosis. Chronic myocarditis (*S. cruzi* not found). Positive complement-fixation test for Chagas' disease. Autopsy: heart weight 520 Gm.; marked dilatation of all cardiac cavities; left ventricular thickness 12 mm. at base and 1 mm. at apex; mural thrombus, endocardial fibrosis, and pseudoaneurysm at the apex of left ventricle; diffuse mononuclear infiltration and fibrosis of myocardium, more severe in the left ventricle.

age. Normal duration of QRS is unusual in cases of complete A-V block; most cases have a widened and slurred QRS of the right bundle-branch block type, sometimes with high voltage.

Right Bundle-Branch Block. This is the most frequent conduction disturbance in chronic Chagas' heart disease.[10, 12] The high incidence of right bundle-branch block contrasts with the rarity (2.2 per cent) of complete left bundle-branch block. The presence of complete right bundle-branch block in patients under 50 years of age from endemic areas has a high diagnostic value.[13] In the endemic area that we studied, Chagas' disease was by far the most common cause of right bundle-branch block. In the nonfatal group right bundle-branch block was found in patients from 6 to 65 years of age, but 88 per cent of the cases were in the age groups 11 to 50 years. The incidence was only slightly higher in the fatal (52.0 per cent) than in the nonfatal (46.8 per cent) group of cases. However, some types of right bundle-branch block had a markedly different incidence in the 2 groups of cases: the wide S type (types 2 and 3) was more common in the nonfatal (26.5 per cent) than in the fatal (14.5 per cent) group, while concordant (type 1) and discordant (types 4 and 5) types were slightly, and the *atypical* type of right bundle-branch block (fig. 11) distinctly more frequent in the fatal than in the nonfatal group of cases. The Rs or qR type of QRS in lead I in the *atypical* type of right bundle-branch block may be changed to a qRS type when the record is made with the patient lying on his right side. Association of right bundle-branch block with conspicuous slurring of R deflection and delayed intrinsicoid deflection, or with a qR type of QRS and high R waves in left precordial leads, was more common in the fatal group of cases. These QRS changes are mostly found in patients over 40 and may in some cases be related to predominant left ventricular enlargement and fibrosis (cases 20, 21, table 4). QRS changes suggesting an anterior wall area of myocardial necrosis (usually in leads V_3, V_4, V_5) was a fairly frequent finding in the fatal group (fig. 12). Three patients with such QRS changes had an area of thinning of the cardiac wall at

the apex of left ventricle (cases no. 15, 17, 18), but in 3 other cases with similar electrocardiographic changes myocardial thinning was not found (cases no. 5, 10, 19, table 4). The typical pattern of myocardial infarction may occasionally be found (fig. 13). On a basis of morphologic analysis of the electrocardiogram, primary abnormalities of the final phase of the ventricular complex was diagnosed in 5.6 per cent of cases in the nonfatal and in 19.5 per cent of cases of the fatal group. It was not possible to exclude digitalis effect in several such cases.

QRST Changes without Intraventricular Block. This group includes chiefly patients of the more advanced age groups in whom no adequate electrocardiographic studies were made. Absence of intraventricular block was found in 44 patients (22 per cent) out of the 200 fatal cases; 11 such cases presented A-V block, without intraventricular block; the remaining 33 patients showed no type of heart block. If the cases in which more than 1 year elapsed between the last electrocardiogram and death of the patient are excluded, only 12 cases (6 per cent) remain in the group without heart block. Nevertheless it may be concluded that the absence of conduction disturbances in fatal cases of chronic Chagas' heart disease is quite uncommon.

Premature Ventricular Contractions. These are common in chronic Chagas' heart disease and were observed in 69.0 per cent of the patients in the fatal group. They are frequently bigeminal, independent of digitalis effect, and commonly multiple and polytopic and increased in number by effort. Runs of ventricular extrasystoles forming bouts of extrasystolic ventricular tachycardia (fig. 14) are seen in patients with advanced heart disease, particularly when under digitalis therapy. More prolonged attacks of ventricular paroxysmal tachycardia may appear spontaneously or under the influence of effort. Patients showing polytopic ventricular premature contractions are prone to sudden death. Digitalis should be employed cautiously.

Abnormalities of P Waves, Atrial Fibrillation or Flutter. A high incidence of marked abnormalities of P waves (23 per cent) and of atrial fibrillation or flutter (16 per cent) was observed in the fatal group of cases, in contrast with the low incidence of these changes in the nonfatal group. The severe prognostic significance of atrial fibrillation in chronic Chagas' heart disease was pointed out by Chagas.[5, 7] Its incidence is higher in the older age groups, but its severity is greater in young patients.

In the autopsy series (table 4) there were 8 patients with marked abnormalities of P waves and 6 patients with atrial fibrillation or flutter. No correlation was found between these electrocardiographic changes and the presence of atrial thrombosis or pulmonary infarcts. Cardiac enlargement was present in all the cases but varied greatly. Congestive heart failure was present in all cases.

Diagnosis

Consideration of the possibility of Chagas' disease in young or middle-aged patients who have been infected with *S. cruzi* in endemic areas of the disease and who present a chronic nonvalvular type of heart disease is the first prerequisite for a correct etiologic diagnosis.

The clinical history is of utmost importance. Detailed information should be obtained on epidemiologic factors operating in the area where the patient was born or has lived (existence of the insect vectors, the type of house the patient has inhabited, the presence of bugs in the house, etc.). A history of heart disease with congestive failure or sudden death in other members of the same family or in other young individuals from the same region is commonly elicited. Patients with the chronic type of heart disease rarely give a clear history of the initial stage of the infection, for this usually occurs in the first years of life. A complement-fixation test for Chagas' disease should be made in any young or middle-aged patient from endemic areas of the disease presenting a myocardial type of heart disease, with conduction disturbances, ventricular premature contractions, diffuse enlargement of the heart, with or without manifestations of congestive heart failure. Complete right bundle-branch block and complete A-V block (usually associated with ventricular premature contractions) in patients under 50 years, from endemic

TABLE 4.—*Clinicopathologic Findings in Twenty-One Cases of Chronic Chagas' Heart Disease with* S. Cruzi *in Myocardial Fibers*

Case, reg. no.	Age (years) and sex	Clinical findings	Anatomic findings*
1 222	6 F	CHF 25 days; acute infection probably occurred 3 years ago; Enlarged superficial lymph nodes; sinus tachycardia; AQRS +60°; low voltage slurred QRS standard leads; prolonged Q-T interval; AT −60°; isoelectric T in V_4, V_5	Chronic, diffuse and focal myocarditis, extensive areas fibrosis, preponderantly subendocardial; endocardial thickening base of left ventricle; CPC lungs, liver, spleen, and kidneys; fat degeneration liver
2† 1.847	15 M	CHF 1 year; marked, bilateral cardiac enlargement. ECG: atrial fibrillation and flutter, complete A-V block, multiple, polytopic ventricular extrasystoles, paroxysmal ventricular tachycardia	HW: 665 Gm.; H & D; aneurysm apex of left ventricle; chronic, diffuse and focal myocarditis; circumscribed pericarditis base left ventricle; moderate intimal hyperplasia small and medium-sized branches coronary arteries; CPC lungs, liver, spleen, and kidneys
3† 160	22 M	CHF 5 years; Adams-Stokes seizures; marked, bilateral cardiac enlargement; ECG; complete A-V block	HW 720 Gm.; H & D, marked; thrombosis right atrial appendage; endocardial fibrosis base left ventricle; chronic myocarditis, ventricles; infarct base of right lung; CPC lungs, liver, spleen, kidneys; medial hypertrophy small intramyocardial arteries; intimal proliferation and edema media of medium-sized coronary arteries
4 193	20 F	CHF 6 months. Functional mitral and tricuspid regurgitation; probable thyrotoxicosis; marked, bilateral enlargement heart. ECG: polytopic, multiple ventricular extrasystoles, runs of paroxysmal ventricular tachycardia, low voltage QRS in standard leads, negative T in L_2, L_3, V_5, V_6, notched R deflections in V_5, V_6	HW 400 Gm.; H & D; mural thrombus and small area thinning apex left ventricle; severe, diffuse, chronic and subacute myocarditis; granulomatous formations with multinucleated giant cells in ventricular myocardium; circumscribed pericarditis base left ventricle; areas infiltrative endocarditis; CPC lungs, liver, spleen, kidneys
5† 1.780	21 M	CHF 8 months; marked, bilateral enlargement cardiac shadow; sudden death; ECG: frequent, polytopic ventricular extrasystoles; prolonged P-R.; type IV RBBB; small R in V_2, V_4	HW 510 Gm.; H & D; chronic myocarditis, with granulomatous formations in right atrium and ventricle; CPC lungs, liver, spleen, kidneys; anasarca; left pulmonary (base) and splenic infarcts; pulmonary tuberculosis; tuberculous lymphadenitis at hilum; miliary tuberculosis spleen
6 1.918	26 M	CHF 7 months; precordial pain on effort; moderate bilateral enlargement of cardiac shadow; ECG: widened notched P waves, multiple, polytopic ventricular extrasystoles, low, slurred QRS in standard leads, AQRS −75°, slurred R in V_5, V_6, QRS-T changes suggesting anterolateral infarction, QS in L_2, L_3, V_F (posterior necrosis?); cardiospasm	HW 390 Gm.; H & D; moderate; extensive mural thrombosis apex left ventricle with marked, local endocardial fibrosis; chronic and subacute diffuse myocarditis, preponderantly left ventricle; epicarditis base left ventricle; fat degeneration liver; CPC lungs, liver, spleen, kidneys
7† J.D.M.	26 M	CHF 8 months; repeated pulmonary embolism; marked, bilateral enlargement heart; ECG: sinus tachycardia, rate 150, polytopic ventricular extrasystoles, incomplete left bundle-branch block	HW 600 Gm.; H & D; thrombosis apex left ventricle and right atrial appendage; chronic, diffuse myocarditis, more severe left ventricle; multiple, bilateral pulmonary infarcts; CPC lungs, liver spleen, kidneys; anasarca
8† 180	28 M	Several bouts CHF last 6 years; Adams-Stokes seizures; marked, bilateral enlargement of cardiac shadow; ECG: complete A-V, block, multiple, polytopic ventricular extrasystoles, atrial fibrillation	HW 750 Gm.; marked H & D; aneurysm apex left ventricle; mural thrombus apex left ventricle; in right atrium and small thrombus base of left and right ventricles; endocardial fibrosis apex left ventricle and base both ventricles; chronic diffuse myocarditis, more severe left ventricle; intimal hyperplasia main branches coronary arteries; hypertrophy media of small intramyocardial arteries; CPC lungs, liver, spleen, kidneys; anasarca

9† 1.730	30 M	CHF 2 years; marked, bilateral enlargement heart; death due to pulmonary embolism; ECG: second degree A-V block, multiple, irregular, polytopic ventricular extrasystoles, abnormal P waves, type IV of RBBB, QS in V_4	HW 500 Gm.; H & D; chronic diffuse myocarditis; aortic atherosclerosis (mild); multiple bilateral pulmonary infarcts; splenic and renal infarcts; CPC lungs, liver, spleen, kidneys; anasarca
10 569	27 F	Death, congestive heart failure; ECG: atrial fibrillation, type IV RBBB, qR in V_3, W-shaped in V_4, and rS in V_5	HW 370 Gm.; H & D: small thrombus apex left ventricle without local thinning of cardiac wall; thrombosis right atrial appendage; chronic diffuse myocarditis with areas subacute inflammation, moderate intimal thickening small branches coronary arteries; CPC lungs, liver, spleen, kidneys
11† 417	35 M	CHF 2 years; marked, bilateral enlargement heart; sudden death; ECG: complete A-V block, frequent, polytopic, ventricular extrasystoles, atrial fibrillo-flutter last 3 weeks	HW 490 Gm., H & D; thrombosis apex left ventricle; chronic diffuse myocarditis; moderate artherosclerosis aorta, coronary and cerebral arteries; pulmonary emphysema; old pulmonary and kidney infarcts; area cerebral softening left hemisphere involving temporal lobe; CPC liver, spleen
12 307	38 M	CHF 6 months; ECG: abnormal P waves, polytopic ventricular extrasystoles, incomplete left bundle-branch block	HW 480 Gm.; H & D; thrombosis apex left ventricle with local thinning cardiac wall; thrombosis right atrium; areas fibrous thickening endocardium, apex and base left ventricle, base right ventricle, and right atrium; severe, diffuse, chronic and subacute myocarditis, preponderantly left ventricle; moderate, diffuse, intimal hyperplasia main branches coronary arteries; CPC lungs, liver, spleen, kidneys
13 1.858	39 M	CHF 18 months; marked, bilateral enlargement heart; ECG: abnormal P waves, polytopic ventricular extrasystoles, deep S in V_2 and high R in V_5, V_6, QRS-ST/T changes suggesting recent high anterolateral infarction	HW 500 Gm.; H & D; preponderantly left ventricle; thrombosis at right atrial appendage; chronic myocarditis, preponderantly left ventricle; CPC lungs, liver, spleen, kidneys
14† 184	40 M	CHF 3 years; Adams-Stokes seizures; marked, bilateral enlargement heart; ECG: complete A-V block, ventricular extrasystoles	HW 540 Gm.; H & D; area endocardial fibrosis base of left ventricle; chronic, diffuse and focal myocarditis with granulomatous formations; intimal proliferation of coronary arteries with marked reduction of vascular lumen in some areas, CPC lungs, liver, spleen, kidneys
15† 198	43 M	CHF 20 months; attacks of paroxysmal tachycardia; syphilitic aortitis; marked, bilateral enlargement cardiac shadow, elongation and cylindric dilatation of aortic arch; terminal bronchopneumonia; ECG: multiple, polytopic ventricular extrasystoles, "concordant inverted" type of RBBB, QS in V_4, V_5	HW 640 Gm.; H & D; endocardial fibrosis apex left ventricle with marked thinning of cardiac wall at this area; chronic diffuse myocarditis; myocardium at apex of left ventricle almost completely fibrosed; syphilitic and atherosclerotic lesions of aortic walls; mild intimal hyperplasia main branches coronary arteries; multiple bilateral pulmonary infarcts; bronchopneumonia; bilateral pachypleuritis; CPC lungs, liver, spleen, kidneys
16† 197	45 M	CHF 2 years; marked, bilateral enlargement cardiac shadow; pulmonary tuberculosis; cachexia; ECG: abnormal P waves, polytopic ventricular extrasystoles, concordant type of RBBB, wide and slurred Q deflection in L_2, L_3 (posterior wall necrosis?)	HW 520 Gm.; H & D; endocardial thickening and mural thrombosis at apex and base of left ventricle and apex right ventricle; diffuse thickening of endocardium of right atrium; chronic myocarditis with granulomatous formations; extensive areas of subendocardial fibrosis left ventricle; mild myocardial lesions at atria and outflow tract of right ventricle; mild hyperplasia of intima of main coronary arteries; mild aortic atherosclerosis; caseous pulmonary tuberculosis; miliary tuberculosis of peritoneum, kidneys; CPC lungs, liver, spleen kidneys

TABLE 4.—*Concluded*

Case, reg. no.	Age (years) and sex	Clinical findings	Anatomic findings*
17† 147	50 M	CHF 2 years; grossly irregular heart action with attacks of paroxysmal tachycardia; bilateral enlargement of the heart; chronic malaria; syphilis; aortic atherosclerosis; fibrosis upper lobe right lung (tuberculosis); ECG: atrial fibrillation, multiple, polytopic ventricular extrasystoles, runs of paroxysmal ventricular tachycardia, low voltage of QRST in standard leads, negative T waves in L_2, L_3, low R deflections in left precordial leads, transient, complete RBBB	HW 340 Gm.; H & D; moderate thinning apex left ventricle; chronic myocarditis, with extensive fibrosis particularly in left ventricle; mild aortic atherosclerosis; irregular hyperplasia intima of coronary arteries with severe reduction of lumen; atherosclerotic kidney disease with old infarcts; pulmonary fibrosis (tuberculosis?); CPC lungs, liver, spleen, kidneys; anasarca
18† 2.019	51 M	CHF 3 years; functional tricuspid regurgitation; atypical precordial pains; marked bilateral enlargement of the heart; aortic atherosclerosis; thrombophlebitis of lower extremities; multiple pulmonary embolism; cardiospasm; cachexia; ECG: partial A-V block, notched and widened P waves, type IV of RBBB, delayed R deflections in V_5, V_6, W type of QRS in V_4, multiple, polytopic ventricular extrasystoles, ventricular scapes	HW 500 Gm.; H & D; mural thrombosis apex left ventricle and right atrium; areas endocardial fibrosis at apex and base of left ventricle; thinning of cardiac wall at apex of left ventricle; chronic myocarditis; aortic and coronary atherosclerosis; atheromatous plaque at mitral valve; multiple infarcts at base of both lungs; multiple splenic infarcts; CPC lungs, liver, spleen, kidneys; anasarca; megaesophagus and megacolon
19 249	55 F	CHF 1 year; ECG: atrial fibrillation, polytopic ventricular extrasystoles, low voltage of QRS in standard leads, RBBB, low R deflections in V_5, V_6	Chronic myocarditis with focal and diffuse fibrosis preponderantly left ventricle, CPC lungs, liver, spleen, and kidneys
20† 199	56 M	CHF 3 years; marked bilateral enlargement of heart; aortic atherosclerosis; terminal bronchopneumonia; ECG: polytopic ventricular extrasystoles, abnormal P waves, incomplete RBBB with slurred R and delayed intrinsicoid deflection in V_5, V_6; primary T wave changes (?)	HW 470 Gm.; H & D; preponderantly left ventricle; chronic myocarditis with diffuse fibrosis, preponderantly subendocardial areas of left ventricle; atheromatous plaque at left coronary artery with moderate reduction of the vascular lumen; CPC of lungs, liver, spleen, kidneys; anasarca; bronchopneumonia
21 1.341	58 M	CHF 4 years; moderate enlargement of cardiac shadow, predominantly left ventricle; aortic atherosclerosis; B.P. 140/90; ECG: frequent, polytopic ventricular extrasystoles, "atypical" RBBB, high, slurred R deflections in V_5, V_6, negative T waves from V_1 to V_6	HW 450 Gm.; H & D; preponderantly left ventricle; chronic myocarditis, preponderantly left ventricle; atherosclerosis coronary arteries; mild atherosclerosis renal arteries; chronic diffuse glomerulonephritis; CPC lungs, liver, and spleen

* Fragments from 8 to 14 different areas of the heart were examined.

† Autopsy performed by Dr. Torres and Dr. Duarte, Division of Pathology, Instituto Oswaldo Cruz. In the remaining cases only the heart and fragments of some organs were available for examination.

H W = heart weight; H & D = hypertrophy and dilatation; C P C = chronic passive congestion; C H F = congestive heart failure; Reg. No. = registration number

Complement-fixation test was positive in all cases. Xenodiagnosis was positive in cases 2, 7, 8, 9, 17, 19, 20, and 21; negative, in cases 1, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18.

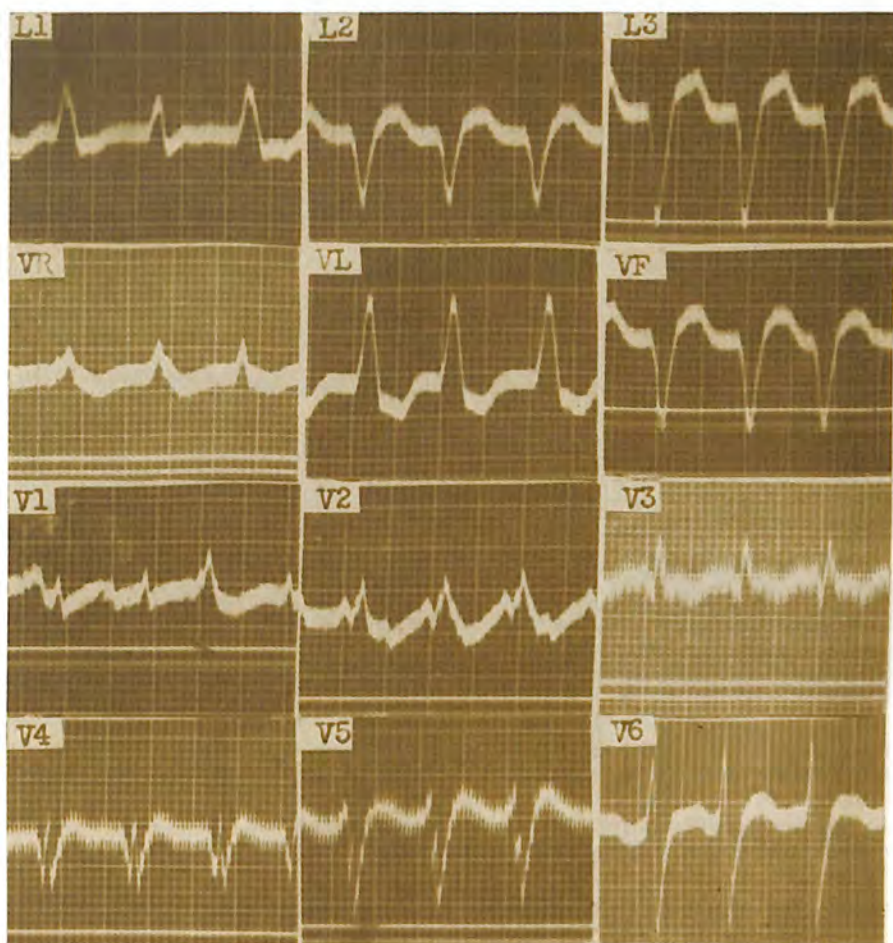



Fig. 12. Right bundle-branch block with qR in V_3, W shaped in V_4, and rS type of QRS in V_5, suggesting anterior necrosis. Case no. 10, table 4. Woman, aged 27. There was no local thinning of the cardiac wall at the apex of left ventricle. The myocardial lesions in this area were not more severe than in other areas of left ventricle.

areas of Chagas' disease, are more commonly associated with chronic Chagas' heart disease.

It may be assumed that a fairly characteristic clinical picture of the cardiopathy with a positive Guerreiro-Machado's reaction constitutes a sound basis for the diagnosis of chronic Chagas' heart disease, despite repeatedly negative results of xenodiagnosis.[13, 15] In 13 out of the 21 cases of chronic Chagas' heart disease proved at autopsy, the diagnosis was made solely on a clinicoserologic basis. In 12 of these cases xenodiagnosis yielded negative results and in some of them repeatedly so. In the remaining 8 patients xenodiagnosis was also positive. Very rarely the complement-fixation test may be negative and the xenodiagnosis may yield positive results.

In its early stages, chronic Chagas' heart disease, in patients under 20 years of age, may be difficult to differentiate from rheumatic carditis. Loud systolic murmurs due to functional mitral or tricuspid regurgitation in some cases of chronic Chagas' heart disease with advanced heart failure may lead to an erroneous diagnosis of valvular heart disease. Coronary heart disease is the most difficult problem in differential diagnosis. Chronic Chagas' heart disease occurs in the younger age groups,

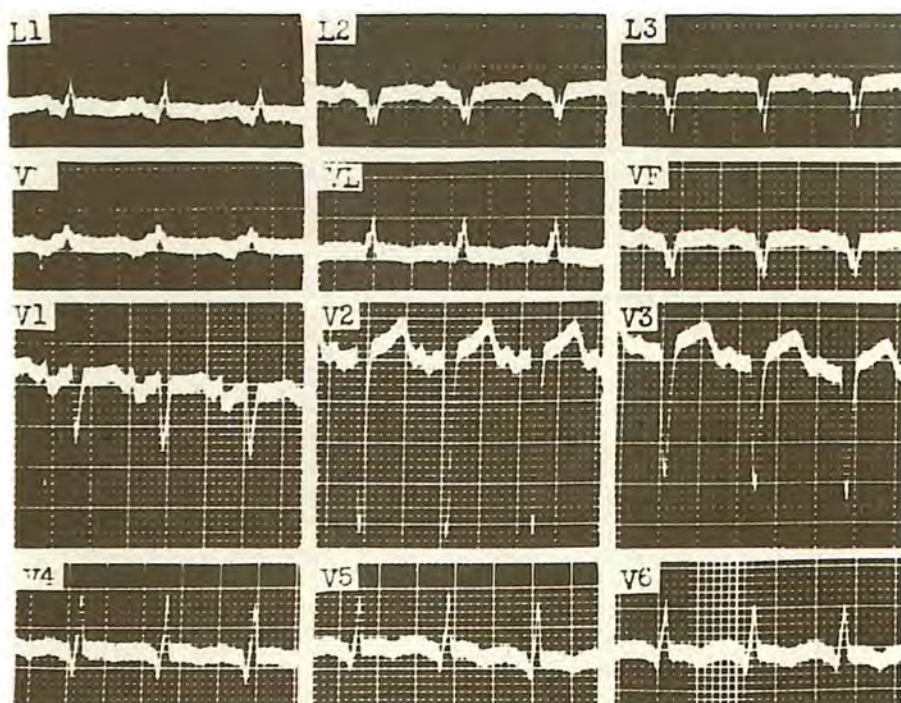



FIG. 13. QRST changes without bundle-branch block. Case no. 6, table 4, aged 26. Marked left axis deviation, deep S in V_2, slurred QRS with delayed intrinsicoid deflection in left precordial leads, suggesting left ventricular enlargement. QS in L_2, L_3, and V_F, suggesting posterior necrosis. QS in V_3 and qR from V_4 to V_6, with ST-T changes, suggesting anterolateral infarction. There were severe chronic and subacute diffuse myocarditis with endocardial fibrosis and mural thrombosis at apex of left ventricle. The main coronary arteries were patent and no myocardial infarction was found.

the patients do not complain of the typical precordial pain; the acute, transient injury changes of the electrocardiogram are not common. In age groups over 50, coronary atherosclerosis is commonly associated with chronic Chagas' heart disease. High blood pressure is unusual in patients with chronic Chagas' heart disease.

At the present stage of our knowledge it seems reasonable to assume that in countries where Chagas' disease exists in an endemic form, such diagnoses as Fiedler's myocarditis, chronic myocarditis of unknown etiology, or myocardial disease of unknown cause should not be made unless Chagas' disease has been adequately excluded as a possible etiologic factor.

Clinical Course and Prognosis

As a rule the heart lesions of chronic *S. cruzi* infection develop and progress slowly. Even after the manifestations of heart failure the patient may survive for a long time. Most cases exhibit several bouts of congestive heart failure until the condition finally becomes irreversible.

In some patients, usually under 30 years of age, the heart condition presents a brief, more severe course. Heart failure supervenes earlier and has no tendency to reversion. There are gross irregularities of cardiac rhythm (ventricular extrasystoles, ventricular tachycardia, atrial fibrillation) and abnormalities of QRS or T waves, without advanced heart block; death is due to congestive heart failure, usually with pulmonary embolism. In the myocardium there are acute and chronic inflammatory lesions; the fibrotic lesions are less marked and *S. cruzi* is usually found with less difficulty (cases 1, 4, and 6, table 4). Such cases could be classified as subacute Chagas' heart disease.

Approximately 55 per cent of the fatal cases

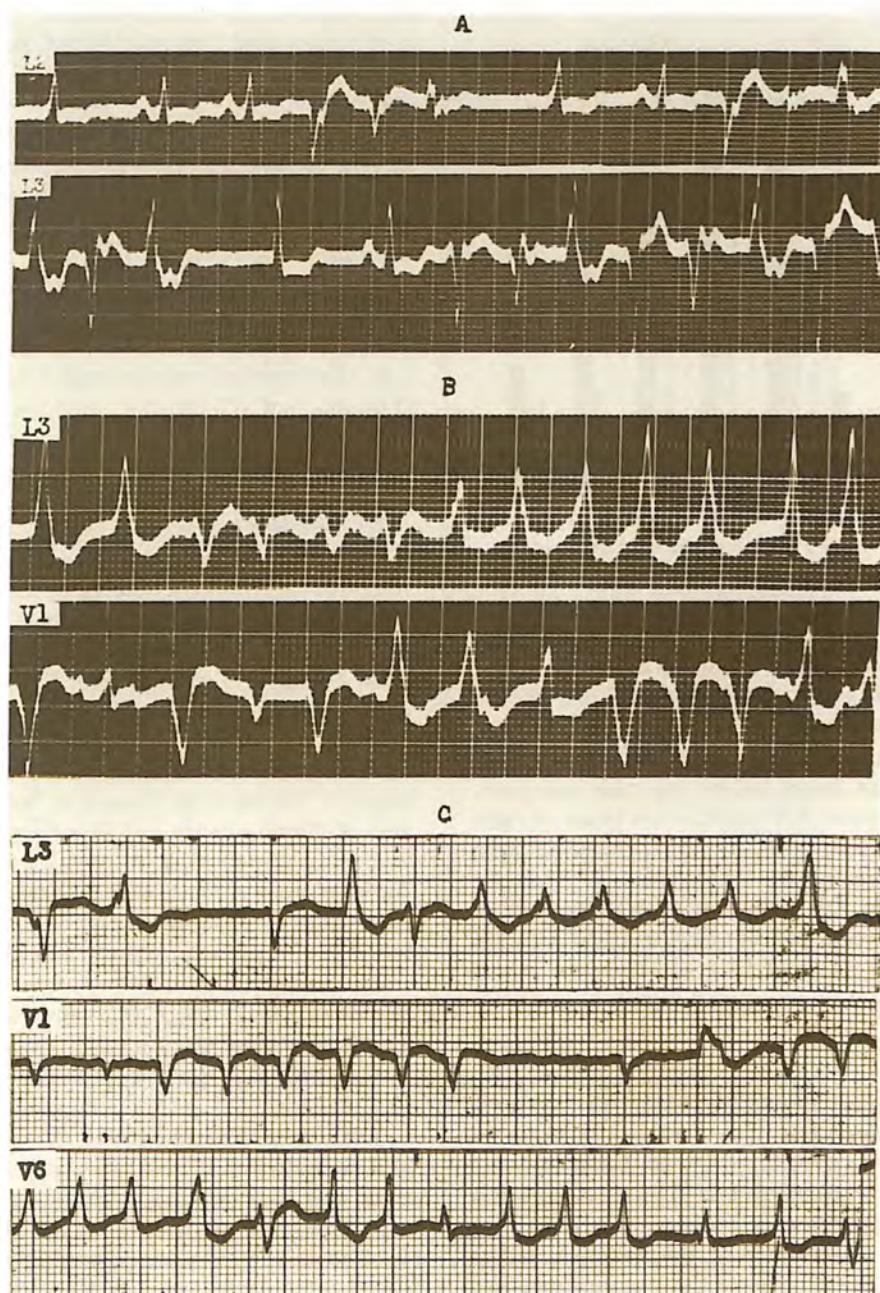



FIG. 14. Complex arrhythmias resulting in chaotic heart action. *A*. Case no. 4, table 4. Woman aged 20. Sinus rhythm; atrial rate 106. P-R = 0.16 sec. Multiple, polytopic premature ventricular contractions, forming bouts of extrasystolic ventricular tachycardia. The patient received small doses of digitalis; ectopic contractions disappeared with discontinuance of the drug. Record made 27 days before death of the patient. *B*. Case no. 1732. Man, aged 47. Atrial tachycardia, rate 187. Bouts of extrasystolic ventricular tachycardia. Record made 3 days before death of the patient. *C*. Case no. 2197. Woman, aged 38. Atrial fibrillation with runs of probably ectopic ventricular contractions (or transient left bundle-branch block of variable degrees?).

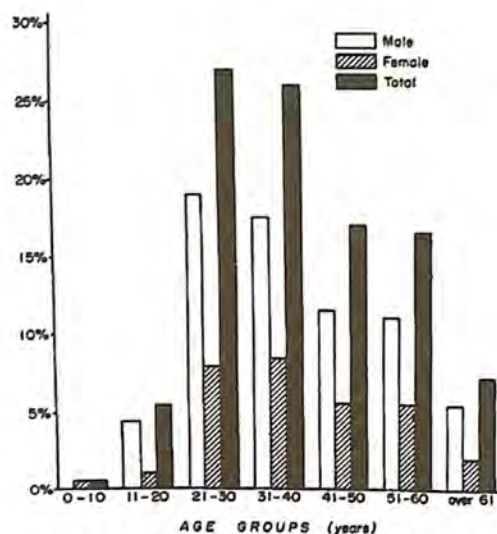



FIG. 15. Age and sex distribution of 200 fatal cases of chronic Chagas' heart disease.

are in the age groups 21 to 40 (fig. 15). Mortality is low in patients up to 20 years of age.

Prognosis is difficult. Sudden and unexpected death is very common in this cardiopathy. Patients with moderately advanced heart damage and without heart failure may die unexpectedly. Complete A-V block, some types of right bundle-branch block, frequent, polytopic ventricular premature contractions, ventricular tachycardia, QRS abnormalities suggesting an area of myocardial necrosis, marked enlargement of the heart, and signs of heart failure are of severe prognostic significance.

Pathology

The cardiac lesions of Chagas' disease were initially described by Vianna,[29] Chagas,[5, 6] Torres,[26-28] and Mazza[19-21] in fatal cases of American trypanosomiasis. The chief anatomic findings included enlargement of all the cardiac cavities; hypertrophy of the heart; a diffuse inflammatory process of the myocardium (occasionally involving the parietal endocardium[28] with diffuse fibrosis and infiltration by lymphocytes, macrophages, and plasma cells, and in some cases eosinophils and polymorphonuclear neutrophils; areas of waxy degeneration of myocardial fibers and the presence of leishmanial forms of *S. cruzi* in myocardial fibers. The condition has been described[5, 6] as an isolated myocardial disease, without involvement of the valvular endocardium or the large vessels.

The number of published autopsy cases of chronic Chagas' heart disease with the presence of *S. cruzi* in the myocardium is small. The pathologic picture of this condition is still only incompletely known.

The chief clinicoanatomic findings in our series of 21 cases with the presence of *S. cruzi* in myocardial fibers are shown in table 4:

1. Heart weight was increased in all cases. Dilatation of all cardiac cavities was pronounced in most cases, particularly the right ventricle and the right atrium. Left ventricular thickness exceeded 15 mm. in 2 cases.

2. Circumscribed areas of endocardial fibrosis (fig. 16*A*) in the left ventricle were present in 15 cases, its localization being as follows: apex 8 cases, base 3 cases, apex and base 4 cases. In 3 of these cases there was also endocardial fibrosis at the apex (1 case) or base (2 cases) of the right ventricle.

Mural thrombus in different stages of organization (fig. 16*B*) at the apex of left ventricle was found in 11 cases. In 7 cases a circumscribed area of thinning of the apical portion of the left ventricle, constituting a pseudoaneurysm of the apex, was present. Mural thrombus at the right atrium or right atrial appendage was found in 7 cases, with endocardial fibrosis in 5.

3. A disseminated inflammatory process of the myocardium (fig. 16*C*) involving all the cardiac walls and septum, sometimes extending to the parietal endocardium, was found in all the 21 cases.

The cellular infiltration was diffuse and focal and consisted chiefly of lymphocytes, plasma cells, and macrophages; eosinophils and polymorphonuclear neutrophils were also present. In 4 cases the myocarditis could be classified as subacute (cases no. 4, 6, 10, 12). A "granulomatous form" of myocarditis was present in 5 cases (no. 4, 5, 11, 14, 16). Collections of lymphocytes and plasma cells in the epicardium (fig. 16*D*) were seen in some cases.

Focal and diffuse fibrosis of the myocardium was present in all cases, its intensity varying in different cases and in the same case from one

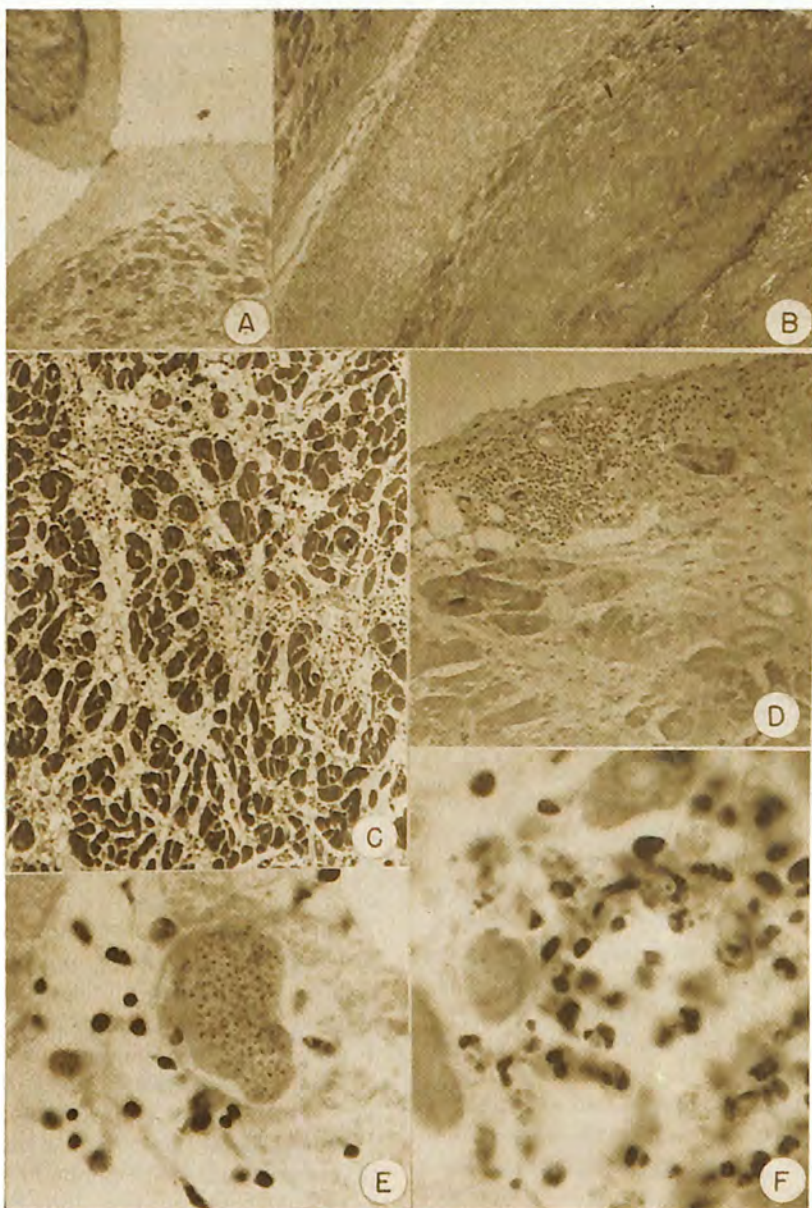



FIG. 16. Heart sections from patients with chronic Chagas' heart disease (table 4).

A. Case no. 1. Endocardial fibrosis. Note myocardial fibrosis at subendocardial areas (Masson stain × 54). *B*. Case no. 16. Endocardial fibrosis and mural thrombosis in different stages of organization at apex of left ventricle (Masson stain × 54). *C*. Case no. 6. Diffuse infiltration and fibrosis of myocardium. This aspect is seen in most sections of myocardium in cases of chronic Chagas' heart disease (H & E × 112). *D*. Case no. 8. Collection of lymphocytes, macrophages, and plasma cells in epicardium (H & E × 112). *E*. Case no. 4. A transverse section of a myocardial fiber containing leishmanial forms of *S. cruzi*. *F*. Case no. 4. Leishmanial forms of *S. cruzi* in myocardium phagocyted by macrophages. Some polymorphonuclear cells are seen in the cellular exudate.

area to another. Fibrosis was conspicuously more severe in the left ventricle followed in order of frequency by the right ventricle and the right atrium. The less severe lesions were found in the left atrium. In 3 cases (no. 1, 16, 20) the fibrosis in the left ventricle was preponderantly subendocardial.

Leishmanial forms of *S. cruzi* in myocardial fibers (fig. 16*E*) were found in all the 21 cases; occasionally the parasite may be seen phagocyted by macrophages (fig. 16*F*). In 3 cases the parasite was found without difficulty on microscopic examination of the heart; in the remaining cases a time-consuming search was necessary. In no case was *S. cruzi* found in any other tissue but the myocardium.

4. Aortic and coronary atherosclerosis was conspicuous in the majority of the patients over 40 years of age. In some of them severe reduction of the lumen of the coronary arteries was present; in others the atherosclerotic lesions were mild.

Obliterative changes of the small and medium-sized branches of coronary arteries, with reduction of the vascular lumen, were present in various cases in the younger age groups. Thickening of the intima and edema or hypertrophy of the media was present in such cases.

Venous congestion and dilatation of capillaries, sometimes with extravasation of red blood cells into the myocardium, were found in most cases. Large thin-walled blood vessels, particularly in areas of extensive myocardial fibrosis, occasionally were observed.

5. Myocardial ischemia is probably an important mechanism in the development and progression of chronic Chagas' heart disease. In the enlarged heart, the vascular lesions and the dynamic factors usually operating in this condition (reduced systolic and pulse pressures, diminution of the capacity of the myocardium to raise systolic pressure, occurrence of frequent ectopic inefficient contractions) may result in coronary insufficiency. Local endocardial thickening, disturbed myocardial nutrition through the Thebesian vessels, and blood stagnation in the venous vessels of the heart have been claimed[1] to play major roles in the production of the ischemic myocardial lesions.

Treatment

No drug has yet been found to be entirely effective against *S. cruzi* infection. A 4-aminoquinoline derivative* and a sulfurated arsenobenzol† are claimed[12] to possess trypanocidal effects on the circulating forms, but not on the intracellular forms of *S. cruzi* and to exert favorable effects on the evolution of some manifestations of the acute infection. Trials on experimentally infected dogs seem to show that a sulfurated arsenobenzol derivative‡ may destroy the blood forms of *S. cruzi* but does not prevent the development of chronic heart disease in these animals.[16] Various other drugs have been tested[16] without encouraging results.

Summary and Conclusions

Triatomid bugs, infected with *Schizotrypanum cruzi*, are widely distributed in this hemisphere, extending from the United States to Argentina. Our knowledge of the incidence and severity of human infection with *S. cruzi* in most of the large endemic areas is still incomplete. In the present state of our knowledge, Chagas' disease should be considered as an essentially cardiotropic infection, caused by *S. cruzi*, having an acute period with multiple, reversible manifestations due to involvement of various tissues and organs. The heart is affected in the majority of cases. A prolonged chronic course follows, with late manifestations of progressive heart involvement (chronic Chagas' heart disease). There is no definite proof as yet whether esophageal involvement (cardiospasm), which occurs so frequently in some endemic areas of Chagas' disease, is related to chronic *S. cruzi* infection.

Acute Chagas' heart disease may be defined as a reversible type of parasitic heart disease, caused by acute *S. cruzi* infection, occurring predominantly in infancy and childhood and anatomically characterized by an acute, diffuse, usually severe, specific myocarditis that eventually leads to heart failure without conspicuous irregularities of the cardiac rhythm.

---

* 7602 (Ac), Bayer

† 9736 (As), Bayer

‡ Spirotrypan (Farbwerke-Hoechst AG.)

Our present concept of chronic Chagas' heart disease is that of a progressive, usually severe type of heart disease, related to chronic *S. cruzi* infection, preponderantly affecting males in the 20- to 50-year age groups, manifested clinically by the almost constant occurrence of disturbances in the formation and conduction of the cardiac stimulus and by congestive heart failure. Anatomically widespread inflammatory changes of the myocardium are usually accompanied by circumscribed lesions of the parietal endocardium and by slowly developing ischemic myocardial changes.

Summario in Interlingua

Scarabeos del genere *Triatoma*, inficite con *Schizotrypanum cruzi*, se trova extensemente distribuite in le Americas inter le Statos Unite e Argentina. Nostre cognoscentias del incidentia e del severitate de infectiones de humanos con *S. cruzi* in le majoritate del grande areas endemic es ancora incomplete. Super le base de nostre cognoscentias currente, morbo de Chagas debe esser considerate como un infection essentialmente cardiotropic, causate per *S. cruzi*, e characterisate per un periodo acute con multiple revertibile manifestationes que resulta del implication de varie histos e organos. Le corde es afficite in le majoritate del casos. Il seque un prolongate curso chronic, con tardive manifestationes de un progressive implication del corde (chronic morbo cardiac de Chagas). Il existe non ancora ulle prova definite que le implication esophagee (cardiospasmo), que occurre si frequentemente in certe areas endemic de morbo de Chagas, es connectite con infection chronic per *S. cruzi*.

Acute morbo cardiac de Chagas pote esser definite como un typo revertibile de parasitic morbo cardiac, causate per acute infection per *S. cruzi* occurrente predominantemente in infantes e juveniles, e characterisate anatomicamente per un acute, diffuse, e usualmente sever myocarditis specific que resulta in le curso del tempore in disfallimento cardiac sin conspicue irregularitates del rhythmo cardiac.

Nostre currente concepto de chronic morbo cardiac de Chagas es le concepto de un progressive e usualmente sever type de morbo cardiac, connectite con infection chronic per *S. cruzi*, afficiente preponderantemente masculos del gruppos de etate inter 20 e 50 annos, e manifeste clinicamente per le quasi constante occurrentia de disturbationes in le formation e le conduction del stimulo cardiac e per congestive disfallimento cardiac. Anatomicamente extense alterationes inflammatori del myocardio es usualmente accompaniate per circumscripte lesiones del endocardio parietal e per le lente disveloppamento de ischemic alterationes myocardial.

References

1. Andrade, Z. A., and Andrade, S. G.: A patologia da doença de Chagas. Bol. da Fundação Gonçalo Moniz **6:** 1, 1955.
2. Chagas, C.: Aspecto clinico da nova entidade morbida produzida pelo Schizotrypanum cruzi. Brasil-méd. **24:** 263, 1910.
3. ——: Nova entidade morbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **3:** 219, 1911.
4. ——: Tripanosomiase Americana. Forma aguda da moléstia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **8:** 37, 1916.
5. ——: Processos patogênicos da trypanosomiase americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **8:** 7, 1916.
6. ——: Sur les altération du coeur dans la trypanosomiasis americaine (Maladie de Chagas). Arch. mal. coeur **21:** 641, 1928.
7. ——, and Villela, E.: Forma cardiaca da trypanosomiase americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **14:** 5, 1922.
8. Dias, E.: Chagas-Krankheit (Chagas' disease). Welt-Seuchen Atlas. Hamburg, Falk Verlag, 1954, Vol. II, p. 135.
9. ——: Doença de Chagas nas Américas. I-Estados Unidos. Rev. Brasil. malariol. **3:** 448, 1951.
10. ——, Laranja, F. S., and Nobrega, G.: Doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **43:** 495, 1945.
11. —— and Laranja, F. S.: Chagas' disease and its control. Fourth Intern. Cong. Trop. Med. and Mal. Washington, Proceed. **2:** 1159, 1948.
12. Laranja, F. S., Dias, E., and Nobrega, G.: O electrocardiograma na cardiopatia cronica da doença de Chagas. Mem. II Cong. Interam. Cardiol., Mexico **3:** 1470, 1946.
13. ——, ——, and ——: Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **46:** 473, 1948.
14. ——, Pellegrino, J., and Dias, E.: Experimental Chagas' heart disease. Abstracted, Am. Heart J. **37:** 646, 1949.
15. ——: Evolução dos conhecimentos sôbre a cardiopatia da doença de Chagas. Revisão crítica da

literatura. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **47:** 605, 1949.

[16] —: Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. Rev. brasil. med. **10:** 482, 1953.

[17] —, DIAS, E., AND PELLEGRINO, J.: Chagas' heart disease: a cardiological entity. Ier. Congress Mondial de Cardiologie. Paris, 1950. Resumès, p. 302.

[18] —, —, —, AND DUARTE, E.: Observações clínicas epidemiológicas sôbre a moléstia de Chagas no Oeste de Minas. O Hospital **40:** 945, 1951.

[19] MAZZA, S.: La enfermedad de Chagas en la Rep. Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **47:** 273, 1949.

[20] —, BASSO, G., BASSO, R., AND JORG, M. E.: Primer caso mortal de forma cronica cardiaca de enfermedad de Chagas, comprobada en Mendoza. Misión estud. pat. reg. Argent. **42:** 3, 1939.

[21] —, AND JORG, M. E.: Diferencias entre anatomia patologica carditis reumatica y carditis de enfermedad de Chagas. Misión estud. pat. reg. Argent. **42:** 79, 1939.

[22] —, BASSO, G., AND BASSO, R.: Ensayos terapeuticos del producto 9736 (As), Bayer, y de su acción comparada con el 7602 (Ac) Bayer en la enfermedad de Chagas. Misión estud. pat. reg. Argent. **61:** 3, 1942.

[23] PEDREIRA DE FREITAS, J. L.: Contribuição para o estudo do diagnóstice da moléstia de Chagas por processos de laboratorio. Tese de doutoramento. Fac. Med. Univ. de São Paulo, 1947.

[24] MUNIZ, J.: Do valor da reação de precipitina no diagnóstico das formas agudas e sub-agudas da doença de Chagas. Brasil-méd. **29:** 261, 1947.

[25] ROMAÑA, C.: Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanosica unilateral (hipotesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad) Misión estud. pat. reg. Argent. **22:** 16, 1935.

[26] TORRES, C. B. M.: Estudo do miocardio na moléstia de Chagas (forma aguda). Alteração na fibra muscular cardiaca. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **9:** 114, 1917.

[27] —: Patogenia de la miocarditis crónica de la enfermedad de Chagas. V Reun. Soc. Arg. Patol. Reg. del Norte, 1930, p. 902.

[28] —: Endocarditis parietale dans la maladie de Chagas (Trypanosomiase americaine). C. R. Soc. Biol. **99:** 886, 1928.

[29] VIANNA, G.: Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Carlos Chagas. Esquizotripanose humana ou Tireoidite parasitaria. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **3:** 276, 1911.

Following his marriage Withering began to cast about for a more profitable practice since his income did not exceed £100 a year. When, therefore, he received an unexpected letter in February of 1775 from Erasmus Darwin telling him of the death of Dr. Small of Birmingham and suggesting that there was thus a good opening for a competent young practitioner in the busy Midland metropolis, he accepted the proposal with enthusiasm. Later in the year he was appointed a junior assistant to Dr. John Ash of the General Hospital. He started in practice in May and moved his family to Birmingham later in the year.

Withering's success in his new environment was immediate. Not only was he taken into social and intellectural circles, but his practice quickly grew to one bringing in an income of £1000 a year, later £2000, an enormous sun for those days—and this despite the fact that he held a daily free clinic for the poor at the General Hospital and is said to have treated three thousand cases annually without charge. He was sought as a consultant from all over the Midland and western counties. He also began to conduct a huge correspondence with distinguished personages who wrote for medical counsel. One such request came from Paris from no less a person than Benjamin Franklin who sought advice about treating his "bladder stone."

In the year 1785 Withering made a record of the distances he had travelled for consultation and found that it added up to 6.303 miles—not far perhaps for these days, but for the horsedrawn vehicles and bad country roads of the eighteenth century it was an astonishing feat. But the time was not wasted, for he occupied himself during his long journeys in making his clinical notes and examining specimens of his plants and minerals.—JOHN F. FULTON. *The Place of William Withering in Scientific Medicine.* J. Hist. Med. & Allied Sc., **8**: 8, 1953.

Comentários

Cardiopatia Chagásica: cinqüenta anos depois, um novo olhar

Andréa Silvestre de Sousa
Laboratório de Doença de Chagas
Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas/Fiocruz

José Antonio Marin-Neto
Divisão de Cardiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Tarefa difícil a de analisar criticamente, mais de cinqüenta anos após sua publicação, um estudo que permanece como marco decisivo na fascinante trajetória médico-científica de cem anos de descoberta da doença de Chagas. Entretanto, dado o valor do trabalho que embasou tal publicação, revisá-lo, mesmo agora, ainda reúne vasto potencial de aprendizado e estímulo ao avanço dos conhecimentos de tão intrigante enfermidade. Mas é necessário ressaltar que essa trajetória iniciou-se de forma absolutamente singular na história da medicina. Em 1909, Carlos Chagas descrevia um novo agente mórbido, o *Trypanosoma cruzi*; o principal mecanismo de transmissão aos humanos, pela via vetorial; noções iniciais de sua imensa dimensão epidemiológica; e muito das manifestações clínicas de uma doença inteiramente desconhecida até então – a qual, longe de constituir raridade, afligia milhões de seres humanos (Chagas, 1909). Curiosamente, essa primeira publicação de Carlos Chagas não é citada no artigo de Francisco Laranja, Emmanuel Dias, Gerard Nóbrega e Aloisio Miranda (Laranja *et al.*, 1956). À parte alguns outros importantes desenvolvimentos científicos na década de 40, a publicação de Laranja e colaboradores pode ser considerada entre as mais expressivas contribuições científicas que culminariam no resgate da relevância médica e social da doença de Chagas, desde o relativo ostracismo em que permaneceu por algumas décadas. Aliás, os autores têm perfeita consciência dessa transição conceitual, quando ressaltam que "O conceito de doença de Chagas como uma rara afecção aguda era geralmente aceito", porém "O real significado médico e social dessa infecção endêmica não era reconhecido". Além de corretamente aplicada à situação então vigente, esta última constatação ainda se mostra tristemente verdadeira, com a doença relegada à categoria das negligenciadas pela comunidade médico-científica.

Também é impressionante verificar como, com poucas exceções, os conceitos emitidos pelos autores, com base em suas observações e descrições de milhares de pacientes, conti-

nuam a se mostrar válidos, mais de cinqüenta anos após sua publicação. Uma dessas exceções reside na relutância em vincular à etiologia da doença de Chagas a ocorrência da esofagopatia, atribuída ao espasmo do cárdia. Em 1956, havia apenas a sugestão dessa associação etiológica, quando se dizia que "até 97% dos pacientes com cardioespasmo em certas áreas do Brasil também possuíam sorologia positiva para a presença do *T. cruzi* (reação de Guerreiro-Machado) e mesmo alterações eletrocardiográficas comumente associadas à cardiopatia chagásica crônica", mas, surpreendentemente, conclui-se que "uma possível ligação etiológica chagásica entre as patologias cardíacas e digestivas requeriam investigações adicionais".

Ainda a título de exemplificação das raras circunstâncias em que a abrangência clínica dos autores não foi absoluta, pode-se questionar a inadequada abordagem do diagnóstico diferencial com a coronariopatia obstrutiva. Entretanto, mesmo sem menção específica ao sintoma anginóide (que se sabe acometer pelo menos 20-30% dos cardiopatas chagásicos crônicos) (Marin-Neto *et al.*, 2007) e sem valorizar as alterações eletrocardiográficas compatíveis com necrose miocárdica nesse contexto, acertadamente os autores registram que "esse é o diagnóstico diferencial mais difícil a ser efetuado".

Essas escassas noções imperfeitas não desmerecem o valor das inúmeras e inequívocas demonstrações da clarividência dos autores naquele artigo, mesmo passado tanto tempo desde sua publicação. Os resultados acumulados de novas pesquisas, aliados a inovações tecnológicas e a armamentários estatísticos elaborados, continuam a sedimentar-se no terreno científico fertilizado. Salvaguardadas as limitações da época, os aspectos clínicos, radiológicos, eletrocardiográficos e patológicos descritos mantêm o seu valor, e ainda se consagram em nossos dias, agora comprovados por modelos matemáticos e números eloqüentes. Se Laranja e colaboradores demonstravam seus resultados de forma meramente descritiva, a verdade essencial do que descreveram hoje se embasa por intervalos de confiança, *p* estatisticamente significativos e modelos matemáticos de risco ou sobrevida, muitas vezes reunindo essas evidências em revisões sistemáticas e metanálises (Mady *et al.*, 1994; Rassi Jr., Rassi & Rassi, 2007; Salles *et al.*, 2003; Rassi Jr. *et al.*, 2006). No entanto, se não conviveram com a época da medicina baseada em evidências – que, temos que reconhecer, às vezes é limitada pela ditadura de números e valores de *p*, em nada podemos desmerecer a importância de suas informações, que apesar de frágeis para os parâmetros vigentes permanecem corretas e nos fazem questionar inclusive a irrestrita confiança por vezes depositada nos atuais modelos de validação científica.

EPIDEMIOLOGIA

Historicamente, a doença de Chagas acometia pacientes restritos a áreas rurais da América Latina, onde as precárias condições habitacionais permitiam amplo contato com o triatomíneo infectado. O recente controle parcial da transmissão vetorial em alguns países da América Latina (Uruguai em 1997, Chile em 1999 e Brasil em 2006), a obrigatoriedade das reações sorológicas no contexto transfusional na década de 80 e as correntes migratórias urbanas e para fora da América Latina mudaram o perfil epidemiológico da doença (Dias, 2007). Um novo conceito de distribuição da doença de Chagas no mundo globalizado se estabeleceu por sua verificação em larga escala nos EUA, inclusive com alguns casos autóctones, gerando a obrigatoriedade do controle transfusional naquele país desde 2006 (Bern *et al.*, 2007), além da disseminação em países da Europa, como a Espanha (Gascon *et al.*, 2007), e mesmo em locais distantes como o Japão (Takeno *et al.*, 1999). Novas e

surpreendentes formas de transmissão, como as ocorridas a partir de transplantes de órgãos (Bern *et al.*, 2007), são descritas em todo o mundo.

No Brasil, mesmo após o controle da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, vivemos o que se pode chamar de uma endemia urbana. Áreas antes preservadas como a Amazônia já apresentam casos autóctones (Xavier *et al.*, 2006), e são também consideradas endêmicas. Além disso, números crescentes de surtos por transmissão oral têm ocorrido na Amazônia e no sul do país (Pinto *et al.*, 2008; Tatto *et al.*, 2007). A forma aguda sobrevive nesses casos de transmissão oral, que se apresentam com particularidades, como a gravidade maior associada ao maior inóculo e manifestações menos usuais como o tamponamento cardíaco (Pinto *et al.*, 2008).

CLÍNICA

Impressionante a preciosidade das descrições da fase cardíaca crônica com suas variadas manifestações eletrocardiográficas, radiológicas e clínicas, com bradi e taquiarritmias, morte súbita e insuficiência cardíaca. Apesar de descrita a possibilidade de formação de trombos intracavitários, o acidente vascular encefálico tromboembólico não foi realçado por Laranja e seus colaboradores. Hoje reconhecemos ter essa complicação da doença de Chagas significado extremamente importante, seja pela mortalidade a ela associada ou pela grave limitação funcional imposta aos sobreviventes (Sousa *et al.*, 2008).

Os autores já compreendiam que as diversas alterações eletrocardiográficas se associavam a significados prognósticos distintos. Por exemplo, apesar de o bloqueio de ramo direito ser bastante freqüente e isoladamente benigno, correlacionava-se a desfecho fatal quando associado à fibrose em parede anterior. Da mesma forma, arritmias ventriculares complexas eram comuns em pacientes com insuficiência cardíaca. Com base na evolução das noções já expostas naquele trabalho, hoje conhecemos modelos estatísticos que associam cada uma das alterações eletrocardiográficas da cardiopatia chagásica a um significado prognóstico, traduzido por disfunção miocárdica moderada a grave, permitindo o início do tratamento dos pacientes por ela acometidos, mesmo quando não há a informação mais refinada do ecocardiograma (Sousa *et al.*, 2001). A incorporação desse método, não disponível à época de Laranja, constituiu fundamental recurso para o entendimento da fisiopatologia e para embasar medidas terapêuticas precoces na evolução natural da doença. Foi possível verificar *in vivo* as alterações primeiramente descritas como aspectos patológicos, que tão caracteristicamente assinalam o caráter segmentar inicial da disfunção ventricular na doença de Chagas. De forma intrigante, no trabalho de Laranja e colaboradores não se destacou a lesão mais típica, inapropriadamente chamada de "pseudo-aneurisma" apical.

Em nosso tempo, o ecocardiograma tornou-se indispensável para o diagnóstico diferencial com outras cardiopatias, definindo o tipo de acometimento miocárdico (difuso ou segmentar), o grau de disfunção ventricular sistólica e diastólica, além da presença de complicações como trombos intracavitários e regurgitações valvares associadas (Acquatella, 2007) e, mais recentemente, avaliação do grau de assincronismo intra e interventricular. Deve-se, no entanto, lamentar que, em muitas circunstâncias, a ecocardiografia tenha negligenciado a avaliação da função ventricular direita, concentrando-se quase que exclusivamente no ventrículo esquerdo. Isso explica parcialmente que a relevância do comprometimento daquela câmara tenha sido mais precocemente detectada com o método da angiocardiografia nuclear (Marin-Neto & Andrade, 1991) e esclarece o mecanismo da congestão sistêmica assinalada por Laranja e colaboradores em chagásicos com insuficiência cardíaca.

TRATAMENTO

Não houve mudança no tratamento etiológico da doença de Chagas nestes últimos cinqüenta anos, e ainda persiste a dúvida sobre os benefícios do benzonidazol na fase crônica da cardiopatia chagásica. Está em andamento grande estudo clínico randomizado, de benzonidazol *versus* placebo (Benefit), envolvendo diversos pesquisadores da América Latina (Marin-Neto *et al.*, 2008).

Os grandes avanços da nossa época são associados ao tratamento da insuficiência cardíaca, estendendo-se empiricamente aos chagásicos os benefícios da terapia tríplice com inibidores da enzima conversora de angiotensina, β-bloqueadores e espironolactona, além do claro benefício do transplante cardíaco (Bochi & Fiorelli, 2001), antes proscrito para a cardiopatia chagásica; também há substanciais recursos para controle de taqui e bradiarritmias, com uso de marca-passos e desfibriladores implantáveis, com ou sem terapia de ressincronização, e possibilidade de ablação de arritmias ventriculares complexas, em casos selecionados. Esperamos com isso reduzir a morbimortalidade desta doença que completa cem anos de descoberta, mas que, infelizmente, permanece negligenciada. É imperativo, sobretudo, manter em foco a noção de acometimento muito predominante em populações de origem humilde e menos abastadas, que hoje se espalham ao redor do mundo em busca de melhores condições de sobrevida.

REFERÊNCIAS

ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*, 115(9): 1.124-1.131, 2007.

BERN, C. *et al.* Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States. *Jama*, 298(18): 2.171-2.181, 2007.

BOCHI, E. A. & FIORELLI, A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. First Guidelines Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology. *The Annals of Thoracic Surgery*, 71(6): 1.833-1.838, 2001.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

DIAS, J. C. P. Southern Cone Initiative for elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(1): 11-18, 2007.

GASCON, J. *et al.* Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart diasease in areas where *Tripanosoma cruzi* infection is not endemic. *Revista Española de Cardiología*, 60: 285-293, 2007.

LARANJA, F. S. *et al.* Chagas disease: a clinical, epidemiological, and pathological study. *Circulation*, XIV: 1.035-1.060, 1956.

MADY, C. *et al.* Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation*, 90: 3.098-3.102, 1994.

MARIN-NETO, J. A. & ANDRADE, Z. A. Por que é usualmente predominante a insuficiência cardíaca direita na moléstia de Chagas? *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 57(3): 181-183, 1991.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 115: 1.109-1.123, 2007.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* On the behalf of Benefit Investigators: rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (Benefit). *American Heart Journal*, 156: 37-43, 2008.

PINTO, A. Y. N. *et al*. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(6): 602-614, 2008.

RASSI JR., A.; RASSI, A. & RASSI, S. G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*, 115: 1.101-1.108, 2007.

RASSI JR., A. *et al*. Development and validation of a risk score for predicting mortality in Chagas' heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 355: 799-808, 2006.

SALLES, G. *et al*. Prognostic value of QT interval parameters for mortality risk stratification in Chagas' disease: results of a long-term follow-up study. *Circulation*, 108: 305-312, 2003.

SOUSA, A. S. *et al*. Modelos preditivos de disfunção sistólica moderada ou grave na doença de Chagas baseados em dados clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos. *Revista Brasileira de Ecocardiografia*, 3: 63-71, 2001.

SOUSA, A. S. *et al*. Prevention strategies of cardioembolic ischemic stroke in Chagas' disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 91(5): 280-284, 2008.

TAKENO, M. *et al*. Chronic Chagas' heart disease in a Japanese-Brazilian traveler: a case report. *Japanese Heart Journal*, 40(3): 375-382, 1999.

TATTO, E. *et al*. Acute Chagas disease outbreak related to sugar cane drunk in Santa Catarina State, South Brasil. *In*: MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, 56, 4-8 nov. 2007, Philadelphia. *Abstracts*, 2007.

XAVIER, S. S. *et al*. Cardiopatia chagásica crônica no rio Negro, estado do Amazonas: relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39: 211-216, 2006.

Revisitando os Achados do Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas do Instituto Oswaldo Cruz em Bambuí, MG: desafios ainda atuais na compreensão da cardiomiopatia chagásica

Joseli Lannes-Vieira

Laboratório de Biologia das Interações, Instituto Oswaldo Cruz

Programa Integrado de Doença de Chagas (PIDC/Fiocruz)

Hoje, sabe-se que a importância médica da tripanossomíase americana precedia a sua descoberta por Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909), pois foram descobertas múmias apresentando sinais clínicos e material genético do *Trypanosoma cruzi* datadas de 9.000 anos (Araújo *et al*., 2009). Contudo, o reconhecimento pela comunidade científica e pela sociedade da importância médica e social da doença de Chagas somente foi possível após o trabalho resultante de um esforço coletivo. Esse trabalho foi iniciado por Carlos Chagas, ao descrever o agente etiológico (*Trypanosoma cruzi*), seu vetor, inseto da família Reduvidae, o ciclo do

parasito e as principais características clínicas da nova doença, e encontrou sustentação e validação nos trabalhos desenvolvidos por Emmanuel Dias, Francisco Laranja e colaboradores nas décadas de 40 e 50, que culminaram com a publicação do artigo de revisão por Laranja e colaboradores em 1956.

Chagas descreveu as principais características da fase aguda da tripanossomíase americana (Chagas, 1909, 1910, 1911, 1916), mostrando que esta nova entidade nosológica apresentava um perfil peculiar de sinais clínicos, tais como distúrbio de excitabilidade cardíaca, distúrbios de condução e bloqueio cardíaco completo, delineando, assim, a forma cardíaca da tripanossomíase americana (Chagas, 1911). Nos anos seguintes, Chagas e Villela (1922), utilizando o então recentemente descrito método não invasivo de acesso e registro da atividade elétrica do coração (eletrocardiografia), assim como parâmetros bem descritos para caracterização das alterações cardíacas, descreveram os perfis eletrocardiográficos da fase aguda e crônica em pacientes infectados pelo *T. cruzi*. Contudo, nesse trabalho o reduzido número de pacientes levou a questionamentos sobre a relação entre os achados clínicos e a presença da infecção pelo parasito, assim como sobre a relevância epidemiológica da tripanossomíase americana (Laranja *et al.*, 1956). Os importantes trabalhos de Mazza (1949) e Romaña (1935), desenvolvidos na Argentina, levaram à identificação da fase aguda de modo completo, incluindo o sinal de porta de entrada do parasito pela mucosa ocular, conjuntivite esquizotripanósica, posteriormente denominado sinal de Romaña. Esse sinal clínico levou à identificação da infecção chagásica aguda em 15 países da América Latina no período de 1913 a 1945 (Laranja *et al.*, 1956), mostrando que a infecção pelo *T. cruzi* era amplamente disseminada nesta região. Contudo, inúmeros questionamentos, incluindo os de autoridades da Saúde e membros da Academia de Medicina, sobre a importância médica e epidemiológica da fase crônica da doença permaneceram (Laranja *et al.*, 1956). Foi a partir da criação do Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas, posto avançado do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) criado em 1943 na cidade de Bambuí, Minas Gerais, coordenado por Emmanuel Dias, que a real situação epidemiológica e a importância social da doença crônica começaram a ser descortinadas, levando à definição da forma cardíaca crônica da doença de Chagas como uma entidade clínico-anatômica distinta.

O Centro de Estudos em Bambuí contava com equipe multidisciplinar, incluindo cardiologista (Francisco Laranja), infra-estrutura e equipamentos para estudos eletrocardiográficos e capacidade de realização de provas sorológicas de Guerreiro-Machado ("calibrado por mais de 250 casos diagnosticados parasitologicamente"). Principalmente, contava com o afinco de pesquisadores dedicados a responder perguntas herdadas de Carlos Chagas, tais como a importância epidemiológica e social da doença de Chagas.

Nos cerca de dez anos de estudos feitos em Bambuí (localidade que na época contava com 26.913 habitantes), foram estudados 235 casos de fase aguda, com acompanhamento eletrocardiográfico, observadas 22 mortes (taxa de mortalidade de 9,4%) devidas a insuficiência cardíaca congestiva, convulsões e infecções associadas, notando-se a maior gravidade e mortalidade em crianças, que em muitos casos apresentavam meningoencefalite (Laranja *et al.*,1956). Interessante notar que a meningoencefalite é a principal manifestação clínica observada nos casos de infecção pelo *T. cruzi* associada à imunossupressão, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), o que levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a considerar a doença de Chagas como uma infecção oportunista na síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) (Vaidian, Weiss & Tanowitz, 2004). Por outro lado, segundo os dados atuais do Ministério da Saúde, com marcante queda em casos agudos por transmissão vetorial após o sucesso do controle do principal vetor no Brasil (Dias, 2007), dos 2.476 casos

agudos notificados 85 foram a óbito, no período 2001-2006, em todas as regiões do território brasileiro (Ministério da Saúde, 2009), com taxa de mortalidade de 3,8%, ainda muito elevada. Em muitos casos, a demora do diagnóstico, e conseqüente tratamento, pode ter contribuído para a alta mortalidade na fase aguda, o que reflete a necessidade de método adequado para o diagnóstico sorológico eficiente e rápido dessa fase da infecção (Coura, 2007).

Como resultado dos estudos realizados em Bambuí, com uso da sorologia e dos exames eletrocardiográficos foi possível a identificação da cardiopatia chagásica, com suas formas oligo e assintomáticas (Prata, 2009). Vários foram os trabalhos publicados a partir desses estudos (Dias, Laranja & Nóbrega, 1945; Dias & Laranja, 1948; Laranja, Dias & Nóbrega, 1948), culminando em 1956 com a revisão intitulada "Chagas disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study" publicada no volume 14, páginas 10.35 a 1.060, da *Circulation*, periódico oficial da American Heart Association, ainda hoje a revista de maior impacto (e maior fator de impacto) na pesquisa em cardiologia.

Na resenha apresentada neste volume por Andrea Silvestre de Sousa e José Antônio Marin-Neto, os diversos aspectos das alterações clínicas, com ênfase na cardiopatia aguda e crônica, foram revistos e contextualizados de forma crítica à luz dos conhecimentos atuais. Assim, nesta resenha, a ênfase recairá sobre alguns aspectos gerais da patologia e, principalmente, os aspectos patogênicos dos achados revistos por Laranja e colaboradores, assim como sua contextualização atual.

No trabalho, Laranja, Dias, Nóbrega e Miranda descrevem as três fases, até aquele momento, do estudo da doença de Chagas: a descoberta por Carlos Chagas; o período de caracterização da fase aguda 1913-1943, com as contribuições de Chagas (1909, 1911, 1916), Vianna (1911) e Torres (1915, 1917), assim como dos médicos argentinos Mazza e Romaña; os cerca de dez anos após a criação do Centro de Estudos do IOC em Bambuí, com a confirmação e considerável extensão dos dados originais de Chagas em pacientes crônicos, a caracterização das formas clínicas e estudos epidemiológicos e sorológicos.

Como um dos resultados dos estudos de Bambuí, o emprego de testes sorológicos (reação de Guerreiro-Machado), associado às características clínicas, permitiu a criação de uma base confiável para o diagnóstico da forma crônica cardíaca doença de Chagas (Laranja *et al.*, 1956). De modo interessante, Laranja e seus colaboradores indicavam a necessidade da realização de inquéritos (entomológicos e de diagnóstico humano) que permitissem o real dimensionamento do significado da doença de Chagas no continente americano. Foi somente no período de 1975 a 1980 que o primeiro Inquérito Nacional de Prevalência, com sistematização das metodologias epidemiológica e sorológica, foi realizado no Brasil. Nesse inquérito utilizou-se o método sorológico de hemaglutinação e coleta de sangue em papel de filtro, técnicas mais simples e confiáveis do que a complexa reação de Guerreiro-Machado (Dias & Prata, 2007). O estudo realizado em localidades com mais de 2.500 habitantes revelou uma prevalência global de 4,2% de infecção pelo *T. cruzi*, mostrando que naquele momento cerca de quatro milhões de brasileiros estavam infectados, com taxas muito altas em alguns estados, como Minas Gerais e Rio Grande do Sul (8,8%), Goiás (7,4%), Distrito Federal (6,1%), Sergipe (6%) e Bahia (5,4%). Esse inquérito teve papel fundamental na priorização e no desenho das estratégias de controle da endemia no Brasil, que resultaram no controle do principal vetor da doença de Chagas (*Triatoma infestans*) em 2006 (Dias, 2007). Inquérito sorológico mais recente, em crianças abaixo de 5 anos de idade, revela, ainda de forma preliminar (com análise de quase cem mil amostras), 0,021% de prevalência, havendo positividade em apenas seis estados (CE, PB, AL, BA, MG e RS), o que indica o sucesso

do controle do vetor e a quebra da transmissão vetorial e reforça a necessidade de que a vigilância entomológica seja mantida (Dias & Prata, 2007).

O estudo da fase crônica em 1.340 pacientes, com acompanhamento eletrocardiográfico, mostrou que a infecção e a doença não faziam distinção entre sexos (650 homens e 690 mulheres). Ainda que faltem estudos estatísticos no trabalho de Laranja e colaboradores (mudança nos estudos médicos adotadas somente algumas décadas depois), a análise dos gráficos mostra maior freqüência de envolvimento cardíaco em homens nas faixas etárias compreendidas entre 20 e 50 anos e equalização nas faixas etárias acima de 50 anos de idade (Laranja *et al.*, 1956, figuras 7 e 8). De forma interessante, estudos recentes vêem demonstrando que a presença de estrogênio é um fator protetor para cardiopatias (Babiker *et al.*, 2002), incluindo a cardiopatia chagásica (Souza *et al.*, 2001).

Na revisão de Laranja e colaboradores, o *Trypanosoma cruzi* (ainda referido como *Schizotrypanum cruzi*) é apresentado como agente etiológico relacionado às manifestações clínicas, corroborando as observações iniciais de Chagas (1909, 1911), Chagas e Villela (1922), Vianna (1911) e Torres (1917). O encontro de formas amastigotas do *T. cruzi* foi registrado em todos os casos estudados de fase aguda (19 dos 22 óbitos registrados no período), associado à miocardite ativa com presença de infiltrados inflamatórios predominantemente mononucleares.

Somente três décadas depois, as observações originais de Chagas, mostrando distúrbios cardíacos em pacientes cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, foram experimentalmente reproduzidas em cães e confirmadas em grande número de pacientes (Laranja, Dias & Pellegrino, 1950; Laranja *et al.*, 1950, 1956). No estudo realizado por Laranja e colaboradores, em todos os 21 casos estudados observou-se aumento do peso cardíaco, com dilatação das cavidades cardíacas. Também nesse estudo, os dados originais de Chagas em cardiopatas crônicos, detectando ninhos de amastigotas em cardiomiócitos e parasitos fagocitados por macrófagos (Chagas, 1916; Chagas & Vilella, 1922), foram confirmados em todos os 21 casos com quadro de cardiomiopatia crônica (CCC) estudados, ainda que fosse uma atividade que consumisse muito tempo em observações microscópicas. As alterações histopatológicas no tecido cardíaco de pacientes cronicamente infectados foram bem caracterizadas, mostrando que tais pacientes apresentam infiltrados inflamatórios difusos e focais, com o predomínio de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, mesmo que eosinófilos e neutrófilos sejam também encontrados. Além disso, fibrose focal e difusa do miocárdio foi encontrada em todos os casos estudados, variando de um caso para o outro e em um mesmo caso, de uma região do tecido para outra (Laranja *et al.*, 1956). Nesse estudo, foi sugerido que a isquemia do miocárdio é uma das principais causas do desenvolvimento e progressão da doença cardíaca crônica na infecção chagásica. Contudo, nessa revisão os autores não tecem considerações maiores sobre a patogenia da CCC. Cerca de quarenta anos antes, Chagas havia compilado seus estudos histopatológicos, em casos agudos e crônicos humanos e em modelos experimentais, propondo que os mecanismos patogênicos que levam às manifestações cardíacas seriam intenso parasitismo associado à intensa miocardite na fase aguda e persistência do parasito, ainda que para encontrá-lo fosse preciso maior tempo de estudo do material, paralela à inflamação na infecção crônica (Chagas, 1916).

Ainda que o trabalho de Laranja e colaboradores reafirme esses achados, mostrando a coexistência do parasito e da inflamação em todos os pacientes CCC estudados, de modo intrigante, durante as décadas seguintes cientistas eminentes não encontraram o parasito nas lesões cardíacas na maioria de casos crônicos da doença de Chagas. Além disso, os achados de tais cientistas levaram à proposição de que na patogenia da CCC estão envolvidos

eventos auto-imunes (Santos-Buch & Teixeira, 1974; Ribeiro dos Santos & Hudson, 1980; Kierszenbaum, 1985). Essa proposição teve impacto negativo no desenvolvimento de novas quimioterapias visando à eliminação do agente etiológico e no desenvolvimento de vacinas contra a infecção pelo *T. cruzi* (Kierszenbaum, 2005). De fato, somente cerca de oitenta anos após os estudos de Chagas (1916), e mais de trinta anos após o artigo publicado por Laranja e colaboradores (1956), a adoção de métodos imunoistoquímicos e de biologia molecular em tecido cardíaco de pacientes CCC (D'Ávila Reis *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1997) e os bem desenhados experimentos de transferência de células em modelos experimentais (Tarleton, Zhang & Downs, 1997) levaram cientistas contemporâneos a resgatar a importância do parasito na patogenia das alterações cardíacas na infecção chagásica crônica. Assim, as propostas atualmente mais aceitas indicam que as injúrias cardíacas crônicas em pacientes chagásicos sejam resultado da resposta imune desregulada induzida pela persistência do parasito (Higuchi *et al.*, 2003; Kierszenbaum, 2005).

Nos últimos anos, houve muitas contribuições ao entendimento da fisiopatogenia da miocardite e da cardiomiopatia chagásica crônica (Higuchi *et al.*, 2003; Marin-Neto *et al.*, 2008). Entretanto, não foram desenvolvidas novas abordagens terapêuticas, além das já disponíveis drogas tripanocidas, Benznidazol e Nifurtimox, desenvolvidas na década de 70, e intervenções objetivando o tratamento de sintomas (Marin-Neto *et al.*, 2008; Soeiro & Castro, 2009). Considerando-se que transplante cardíaco é o único tratamento efetivo para milhões de pacientes que já desenvolvem, ou desenvolverão em futuro próximo, a insuficiência cardíaca grave, terapia celular objetivando a recuperação da função cardíaca, ainda restrita a ensaios clínicos, tornou-se uma perspectiva plausível (Soares *et al.*, 2007). Assim, o principal desafio atual é o desenho de tratamentos eficazes para a cardiomiopatia induzida pelo *T. cruzi*, com o desenvolvimento de estratégias que reduzam a inflamação, associada aos danos teciduais (Freitas *et al.*, 2005), sem interferir com o controle do parasitismo (Lannes-Vieira *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2009). Para tal, o resgate do conhecimento gerado pelos trabalhos desenvolvidos no Centro de Estudos do IOC em Bambuí, revisados por Laranja e colaboradores (1956), pode contribuir para trazer para o momento atual as questões levantadas naquela época sobre a origem das alterações patológicas, suas relações com os quadros clínicos e a necessidade de desenvolver drogas tripanocidas e intervenções terapêuticas que melhorem o prognóstico dos pacientes.

Assim, os trabalhos realizados no Centro de Estudos do IOC em Bambuí por Emmanuel Dias, Francisco Laranja e seus colaboradores envolvendo cerca de 2.100 pacientes cronicamente infectados e 280 casos agudos contribuíram enormemente para a confirmação junto à comunidade médica e científica, assim como às autoridades da Saúde, da importância médica e social da doença descrita quase cinqüenta anos antes por Chagas (1909). Esse modelo de estudo multidisciplinar, e tudo o que se seguiu a ele, como o tratamento e acompanhamento dos pacientes, realizados ainda hoje pelas equipes médicas que continuaram o exemplo de Dias, Laranja e colaboradores, nos servem de exemplo de como a determinação e a dotação de recursos públicos, com equipamentos de tecnologia de ponta e pessoas altamente qualificadas, munidas de determinação e paixão, podem contribuir para o esclarecimento de uma questão científica e social, dando retorno à sociedade à medida que a instrumenta com o conhecimento para a busca de solução para seus problemas. Por último, fica a lição de que a boa ciência encontra seu lugar no espaço e no tempo, assim como permanece atemporal e servindo de exemplo para gerações futuras, que a redescobrem nesta oportunidade de comemoração e delas podem se apossar de modo a construir ações que mudem o curso dos ainda milhões de indivíduos portadores da infecção chagásica.

Agradecimentos

Agradeço à dra. Tania C. de Araújo-Jorge, diretora do Instituto Oswaldo Cruz, pela leitura crítica e sugestões que melhoraram a qualidade deste documento.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. *et al.* Antes de Carlos Chagas: paleoparasitologia da infecção por *Trypanosoma cruzi*. *In*: CARVALHEIRO, J. R. *Clássicos em Doença de Chagas: história e perspectivas no centenário da descoberta*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2009.

BABIKER, F. A. *et al.* Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res 53*: 709-719, 2002.

CHAGAS, C. R. J. Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n.g., n.sp.*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

CHAGAS, C. R. J. Nova entidade mórbida do homem: resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3: 219-275, 1911.

CHAGAS, C. R. J. Processos patogênicos da tripanossomíase americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 8: 5-35, 1916.

CHAGAS, C. R. J. Aspecto clínico geral da nova entidade mórbida produzida pelo *Schizotrypanum cruzi*. *Brasil Médico*, 27: 263-265, 43: 423-428, 44: 433-437, 45: 443-447, 1910. *In*: CHAGAS, C. *Coletânea de Trabalhos Científicos*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1981.

CHAGAS, C. R. J. & VILLELA, E. Cardiac form of American trypanosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 14: 3-54, 1922.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed-a background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 113-122, 2007.

D'ÁVILA REIS, D. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48: 637-644, 1993.

DIAS, E. & LARANJA, F. Chagas' disease and its control. INTERNATIONAL CONGRESS FOR TROPICAL MEDICINE AND MALARIA, IV, Washington DC, 1948. *Revue du Paludisme*, 7:38, 1948.

DIAS, E.; LARANJA, F. S. & NÓBREGA, G. Doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 43: 495-582, 1945.

DIAS, J. C. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas' disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 11-8, 2007.

DIAS, J. C. P. & PRATA, A. R. Primeiro Inquérito Sorológico Nacional para Doença de Chagas (Brasil, 1975-1980), 2007. Portal Doença de Chagas. Disponível em: <www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=37>. Acesso em: 9 mar. 2009.

FREITAS, H. F. *et al.* Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1.220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, 102: 239-247, 2005.

HIGUCHI, M. D. *et al.* Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56: 485-489, 1997.

HIGUCHI, M. L. *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research*, 60: 96-107, 2003.

JONES, E. M. *et al.* Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48: 348-357, 1993.

KIERSZENBAUM, F. Is there autoimmunity in Chagas disease? *Parasitology Today*, 1: 4-6, 1985.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas' disease? *Trends in Parasitology*, 21: 513-516, 2005.

LANNES-VIEIRA, J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 299-304, 2003.

LARANJA, F. S.; DIAS, E. & NÓBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: clínica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 46: 473-529, 1948.

LARANJA, F. S.; DIAS, E. & PELLEGRINO, J. Chagas' heart disease: a cardiological entity. CONGRÈS MONDIAL DE CARDIOLOGIE, I, 1950, Paris. *Résumés*, p. 302.

LARANJA, F. S. *et al.* A cardiopatia experimental da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 3: 433-434, 1950.

LARANJA, F. S. *et al.* Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*, 14: 1.035-1.060, 1956.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Benefit investigators rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole evaluation for interrupting Trypanosomiasis (Benefit). *American Heart Journal*, 156: 37-43, 2008.

MARINO, A. P. *et al.* Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (Rantes) antagonist (Met-Rantes) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation*, 110: 1.443-1.449, 2004.

MAZZA, S. La enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 47: 273-288, 1949.

MEDEIROS, G. A. *et al.* Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-Rantes) results in amelioration of cardiac tissue damage. *Microbes and Infection*, 11: 264-273, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br>. Acesso em: 9 mar. 2009.

PRATA, A. R. Emmanuel Dias e a doença de Chagas. 78-81. In: DIAS, J. C. P. (Org.). *Dr. Emmanuel Dias*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

REIS, M. M. *et al.* An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 83: 165-172, 1997.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. & HUDSON, L. *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 40: 36-41, 1980.

ROMAÑA, C. Acerca de um síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanosica unilateral: hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad. *Misión de Estúdios de Patologia Regional Argentina*, 22: 16, 1935.

SANTOS-BUCH, C. A. & TEIXEIRA, A. R. The immunology of experimental Chagas' disease. 3. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 140: 38-53, 1974.

SOARES, M. B. *et al.* Cellular therapy in Chagas' disease: potential applications in patients with chronic cardiomyopathy. *Regenerative Medicine*, 2: 257-264, 2007.

SOEIRO, M. N. & CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13: 105-121, 2009.

SOUZA, E. M. *et al.* Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitology Research*, 87: 513-520, 2001.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. & DOWNS, M. O. 'Autoimmune rejection' of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 3.932-3.937, 1997.

TORRES, M. Alguns fatos que interessam à epidemiologia da moléstia de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 7: 120-138, 1915.

TORRES, M. Estudo do miocárdio na moléstia de Chagas (forma aguda). I. Alterações da fibra muscular cardíaca. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 9: 114-139, 1917.

VAIDIAN, A. K.; WEISS, L. M. & TANOWITZ, H. B. Chagas' disease and Aids. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 3: 2, 2004. Disponível em: <www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=420481&blobtype=pdf>. Acesso em: 9 mar. 2009.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Carlos Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3: 276-300, 1911.

13

JOFFRE MARCONDES DE REZENDE

Megaesôfago por doença de Chagas.

Revista Goiana de Medicina, 2(4): 297-314, 1956.

Joffre Marcondes de Rezende (1921)

Médico nascido em Minas Gerais, dedicou suas pesquisas às repercussões da doença de Chagas no aparelho digestivo, tendo publicado como autor e co-autor mais de uma centena de trabalhos científicos, no Brasil e exterior.

MEGAESÔFAGO POR DOENÇA DE CHAGAS

Joffre Marcondes de Rezende *
Goiânia

O título dêste trabalho deveria ser, na realidade, 'Megaesôfago e Megacolo por Doença de Chagas". Trataremos, entretanto, sòmente do megaesôfago, por dispormos de maior número de casos desta condição, devendo muitas das conclusões serem válidas também para o megacolo, de vez que se admite unidade de mecanismo etiopatogênico para ambas as condições (36).

A relação entre a tripanosomose americana e o 'mal de engasgo' fôra já admitida por *Carlos Chagas* em 1916 (8). *Chagas* e *Vilela* (9), em 1922, descreveram 4 casos de megaesôfago em 63 doentes de tripanosomose. Desde então, numerosos autores nacionais (1-2-3-4-5-19-24-25-26-28-29-30-34-37) têm admitido a possibilidade da etiologia chagásica para os "megas", tão comuns em nosso País, baseados sobretudo na alta positividade das provas laboratoriais para Doença de Chagas em portadores de megaesôfago. Dêsses trabalhos ressaltamos, pela sua argúcia, a revisão feita por *Bulcão* (4) em 1950. Outro argumento interessante se deve a *Nunan e col*. (26) que, revendo, em Bambuí (Minas), 13 crianças nas quais se diagnosticara antes a fase aguda da Doença de Chagas encontraram alterações radiológicas do colo em 4. São suas as seguintes palavras: "Tudo leva a crer que muitos casos de megacolo adquirido e megaesôfago guardem relação etiológica com a Doença de Chagas".

Os clínicos e cirurgiões do Triângulo Mineiro, baseados exclusivamente na observação quotidiana dos consultórios sempre admitiram a etiologia chagásica para os megas e o assunto tem si-

---

* Da Sociedade Brasileira de Gastrenterologia — Médico Sanitarista da Secretaria de Saúde e Assistência do Estado de Goiás.

do debatido em vários Congressos regionais, como tivemos ocasião de ouvir de *José de Paiva Abreu* no VII Congresso Médico do Brasil Central realizado em Uberlândia em junho de 1955.

Como nenhum trabalho ainda se fez nesse sentido no Estado de Goiás, julgamos oportuno divulgar nossa modesta contribuição ao importante tema.

Convencidos da etiologia chagásica dos "megas" em nosso meio, desde janeiro de 1955 vimos reunindo os casos de nossa clínica particular e do Ambulatório da Santa Casa de Goiânia com o intuito de estabelecer a relação causal entre as duas entidades mórbidas.

Até o mês de junho de 1956, portanto durante 18 mêses logramos reunir mais de uma centena de casos, o que demonstra eloquentemente a elevada incidência do megaesôfago no Estado de Goiás.

A série que apresentamos neste trabalho compõe-se de 170 pacientes, 40 dos quais observados pelos médicos do Hospital Rassi e os restantes por nós. Em 85 dentre os 170 pacientes praticou-se a reação de fixação do complemento para Doença de Chagas e em 50 foram feitos traçados eletrocardiográficos.

Distribuição geográfica. Para a confecção do nosograma da doença não consideramos a 'residência atual' do enfêrmo e sim aquela coincidente com o aparecimento da enfermidade. Com êste critério e excluindo os casos procedentes de outros Estados (Minas, São Paulo, Bahia e Piauí) encontramos em 150 casos procedentes do Estado de Goiás a seguinte distribuição por município: (fig. 1)

Município	Casos	Município	Casos
Anápolis	10	Lages	2
Anicuns	7	Leopoldo de Bulhões	1
Arraias	2	Luziânia	4
Aurilândia	2	Mataúna	1
Bela Vista de Goiás	1	Mossâmedes	3
Buriti Alegre	1	Morrinhos	2
Caldas Novas	1	Nazário	2
Catalão	4	Niquelândia	2
Céres	3	Orizona	3
Corumbá de Goiás	1	Palmeiras de Goiás	3
Dianópolis	1	Petrolina de Goiás	4
Firminópolis	2	Piracanjuba	3
Formosa	5	Pirenópolis	4

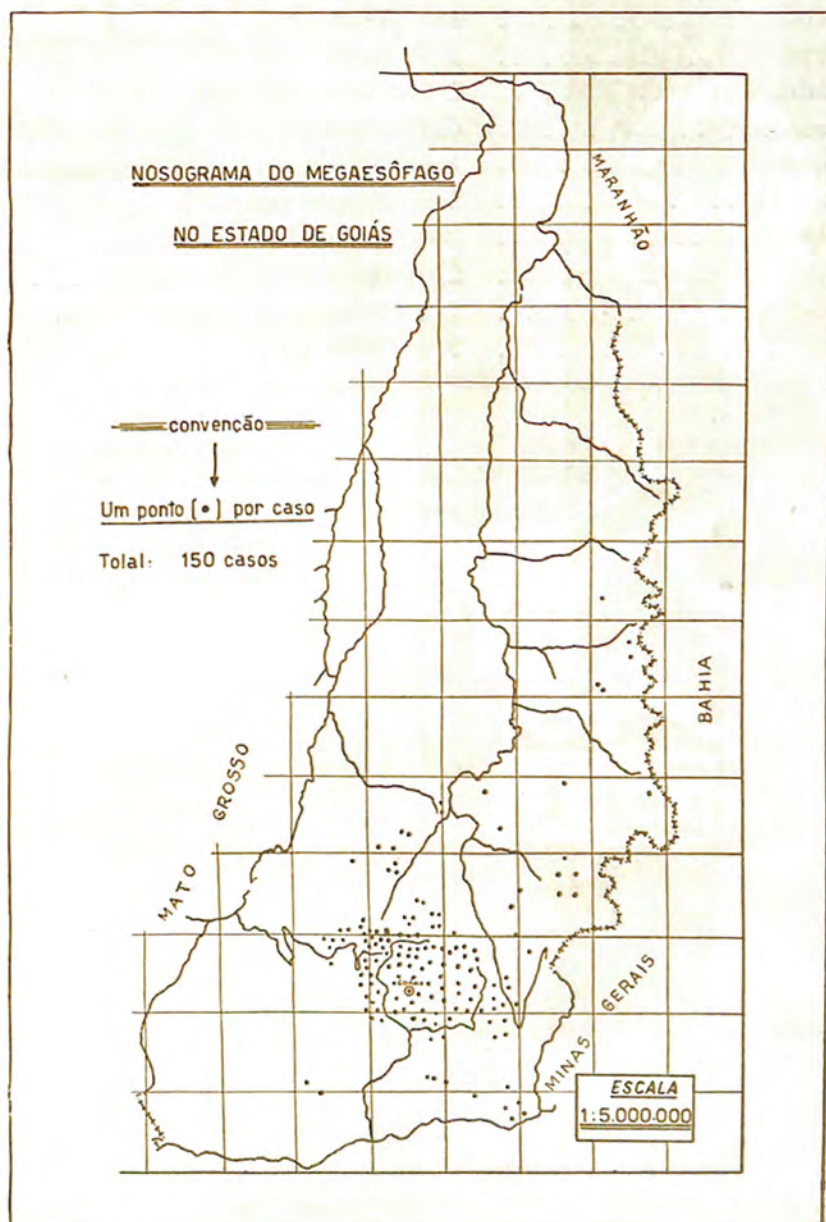



Fig. 1 — Distribuição geográfica de 150 casos de megaesôfago procedentes do Estado de Goiás.

Goianésia	2	Pires do Rio	5
Goiânia	16	Posse	1
Goiás	2	Rio Verde	1
Guapó	2	Rubiataba	1
Hidrolândia	1	Santa Cruz de Goiás	1
Inhumas	6	Santa Helena	1
Ipamerí	1	Silvânia	5
Iporá	1	Taguatinga	2
Itaberaí	8	Trindade	5
Itapací	2	Uruaçú	1
Itauçú	7	Uruana	1
Jaraguá	3	Vianópolis	1

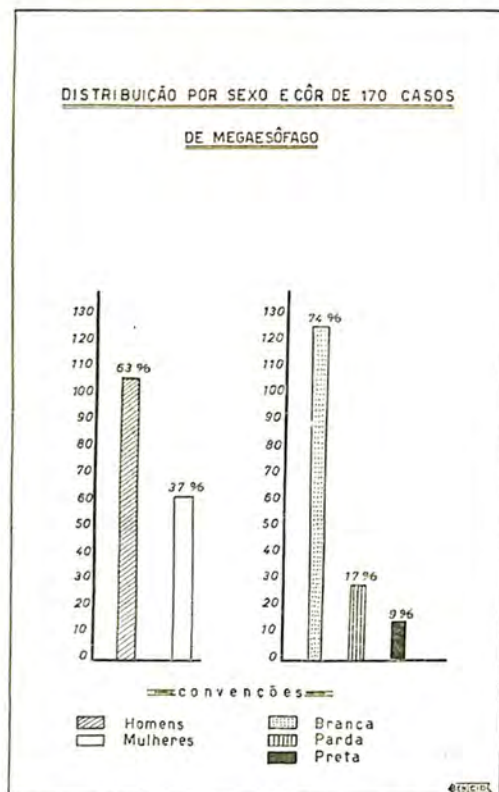



Fig. 2 — Distribuição por sexo e cor de 170 casos de megaesôfago.

Sexo. Em nossos casos, 107 ou 63% eram homens e 63 ou 37% eram mulheres. Vê-se, portanto, que houve predominância do sexo masculino sôbre o feminino. (fig. 2)

Côr. Na presente série, tivemos a seguinte distribuição segundo a côr:

Brancos	126	73%
Pardos	29	18%
Pretos	15	9%

A incidência é pràticamente a mesma entre as raças, considerando-se que o percentual de indivíduos da raça negra em Goiás, segundo dados do censo demográfico de 1950 é cêrca de 11%. Há ligeira discordância nos dois outros grupos, o que atribuimos à diversidade de critério para a côr parda, cujo percentual demográfico segundo o mesmo censo, é de 31%.

Profissão e condição social. Distribuem-se os nossos pacientes pelas seguintes profissões:

Lavradores	66
Domésticas	57
Trabalhadores	13
Industriários	8
Comerciários	4
Fazendeiros	3
Comerciantes	3
Funcionários públicos	3
Motorista	1
Militar	1
Profissão liberal	1
Menores	10
Total	170

Tem-se afirmado que o megaesôfago é doença da extrema pobreza alegando-se a importância do fator alimentar, condições de higiene, etc. (10, 30).

Nossa experiência, ainda que pequena, leva-nos a raciocínio diferente. O megaesôfago, em nosso país, é afecção própria da zona rural. Por determinantes econômicas e educacionais as nossas populações rurais apresentam baixo padrão de vida, porém nem sempre isto se verifica. Em nossa casuística figuram pacientes de nível econômico mais elevado, residentes em zona urbana, porém, tal co-

mo refere *Freitas Junior* (19) todos êles, sem exceção, residiram por algum tempo na zona rural (fazendas ou pequenos povoados).

O movimento migratório que de há alguns anos para cá se processa dos campos para os centros urbanos proporciona o encontro de casos de megaesôfago em número cada vez maior nas grandes cidades. Os antigos lavradores transformam-se em operários, funcionários, comerciários, etc.

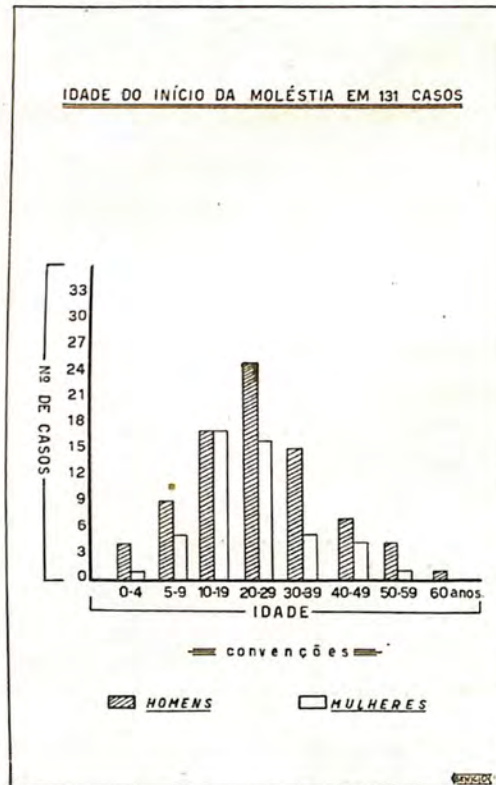



Fig. 3 — Distribuição por períodos etários de 131 casos de megaesôfago, considerando a idade do início da moléstia.

Idade do início da moléstia. Em 131 dos 170 casos foi possível determinar a idade do início da moléstia, ou seja, dos primeiros sintomas. Encontramos a seguinte distribuição por períodos etários: (fig. 3)

0-4 anos	5 casos
5-9 anos	14 casos
10-19 anos	34 casos
20-29 anos	41 casos
30-39 anos	20 casos
40-49 anos	11 casos
50-59 anos	5 casos
60 .. anos	1 caso
Total	131 casos

Conforme se vê o megaesôfago incide preferentemente na 3.ª década da vida, a julgar pelos dados acima.

Tempo decorrido entre o início da moléstia e a 1.ª consulta.

Os doentes de megaesôfago dificilmente procuram o médico no início de seus padecimentos. Em 131 casos tivemos o seguinte intervalo entre o início da moléstia e o 1.º tratamento realizado (12 doentes haviam sido tratados anteriormente em outros serviços):

0-2 anos	32 casos
2-5 anos	34 casos
5-10 anos	33 casos
10-20 anos	21 casos
mais de 20 anos	11 casos
Total	131 casos

Associação de megaesôfago e megacolo. Muito a contra gôsto não pesquisamos sistemàticamente pelo exame radiológico a existência de megacolo em nossos doentes de megaesôfago. Utilizando-nos apenas da anamnese e exame físico, pudemos firmar com segurança o diagnóstico de megacolo em 16 casos (9,4%). Em 4 casos em que se fez enema opaco êsse diagnóstico foi confirmado. Observamos com Dr. José Normanha de Oliveira que é frequente a distensão gasosa do ângulo esplênico do colo em portadores de megaesôfago, mesmo naquêles que não padecem constipação, o que talvez já seja indício precoce de comprometimento do colo.

Reação de fixação do complemento. Foi realizada em 85 pacientes, não selecionados. Parte das reações foi executada em Goiânia pelo Dr. Carlos Borges, segundo técnica qualitativa preconizada por Pellegrino; a outra parte foi feita pela técnica quantitativa nos Laboratórios das Faculdades de Medicina de Ribeirão Preto e São Paulo.

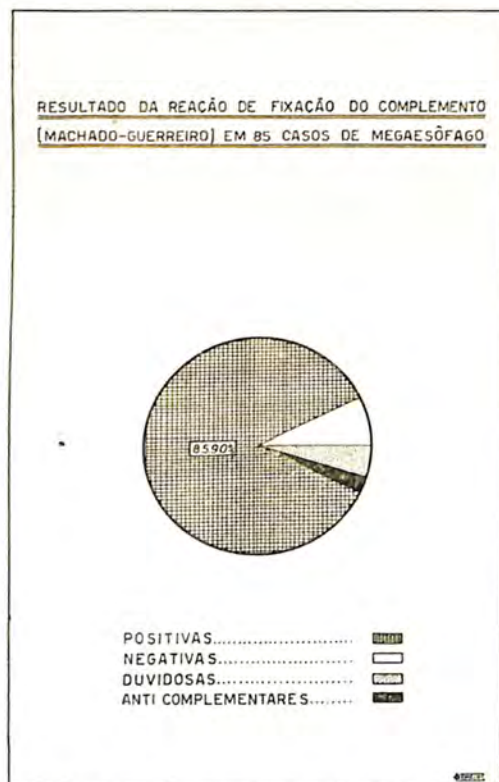



Fig. 4 — Resultado da investigação sorológica para Doença de Chagas em 85 casos de megaesôfago.

Foram obtidos os seguintes resultados: (fig. 4)

Reações positivas	73	85,90%
Reações negativas	6	7,05%
Reações duvidosas	4	4,70%
Reações anti-complementares .	2	2,35%
Total	85	100,00%

A percentagem de positividade nesta série é ligeiramente superior à obtida por Jácomo em Uberaba e relatada por *Freitas Junior* (19) e inferior à encontrada por *Laranja* e col. (24), em casos de megaesôfago e por *Cutait* (11) em casos de megacolo.

Estudo eletrocardiográfico. Foram feitos eletrocardiogramas em 50 pacientes, dos quais 46 com reação de Machado Guerreiro positiva, 2 com reação negativa e 2 com reação anti-complementar. Dos 50 eletrocardiogramas, 22 foram normais e 28 foram considerados anormais, incluindo-se 4 cuja única alteração consistia em taquicardia sinusal. Dos 28 pacientes que apresentaram ECG anormal apenas 1 apresentou a reação de Machado Guerreiro negativa.

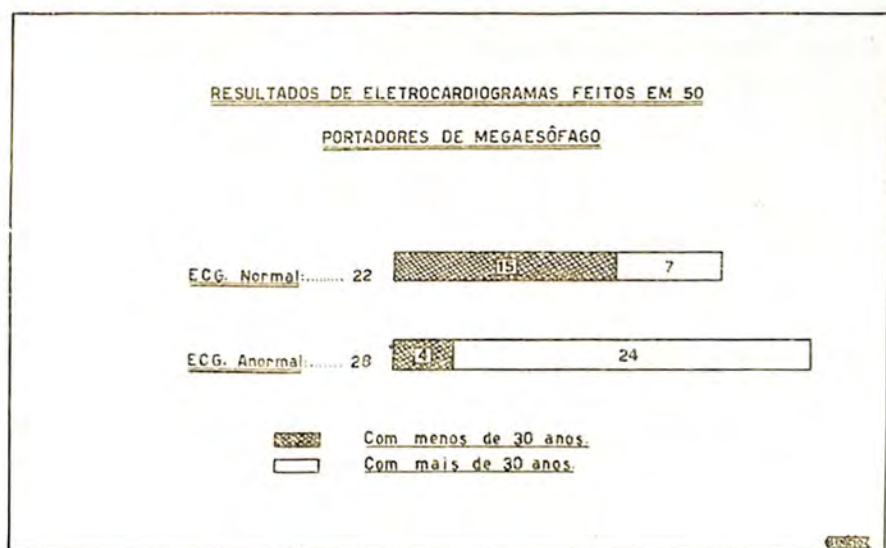



Fig. 5 — Resultados dos eletrocardiogramas em 50 casos de megaesôfago. Vê-se que os traçados anormais predominam em pacientes com mais de 30 anos.

Foram as seguintes as alterações encontradas:

BRD completo . . . . 4 casos
BRD incompleto . . . . 1 caso
BRD completo e extrassístoles ventriculares . . . . 2 casos
BRD completo, extr. ventr. e alt. da onda T . . . . . . 1 caso
BRD completo, BAV 1.º grau e extr. ventriculares . . . . 1 caso
BRE completo . . . . 1 caso
BRE incompleto e extr. auriculares e ventr. . . . . 1 caso
Extrassístoles auriculares . . . . 2 casos

Extrassístoles ventriculares	5 casos
Extrassístoles ventr. e baixa voltagem do QRS	1 caso
Baixa voltagem do QRS	2 casos
Alterações primárias da onda T	2 casos
Alterações primárias da onda P	1 caso
Taquicardia sinusal	4 casos
Total	28

E' interessante assinalar que os ECG normais predominaram em pacientes com menos de 30 anos, enquanto os anormais foram encontrados principalmente em pacientes de mais idade. Isso nos leva à suposição de que o comprometimento do esôfago, na Doença de Chagas, quando presente, antecede à lesão cardíaca, pelo menos no que diz respeito à exteriorização clínica. (fig. 5)

COMENTÁRIO

Do que foi exposto podemos tirar algumas conclusões. Vemos que o norte do Estado contribui com pequena parcela de casos e que êstes se vão tornando mais raros à medida que avançamos rumo ao extremo norte. Embora a densidade demográfica seja maior no sul e centro do Estado, é digno de nota o fato de não terem sido encontrados triatomídeos infectados nos municípios mais setentrionais de Goiás (6). (fig. 1)

Em nossa série predominam de maneira absoluta os habitantes da zona rural, lavradores e suas esposas e familiares. Os demais, ao serem interrogados, revelaram, sem exceção, terem residido durante algum período de suas vidas, na zona rural, em fazendas ou pequenos povoados.

Verificamos que o megaesôfago incide de preferência na 3.ª década de vida, entre 20 e 30 anos, porém os pacientes procuram tratamento geralmente alguns anos mais tarde. Talvez por esta razão se tem considerado a maior incidência entre 30 e 40 anos (19).

Quanto ao sexo, predomina o masculino sôbre o feminino, na proporção de 2: 1, proporção bem inferior à relatada por *Freitas Jr.* (19) que conta, todavia, com casuística bem maior que a nossa.

Vale mencionar que o megaesôfago, em outros países, atinge igualmente ambos os sexos (27,35). A predileção do megaesôfago pelo sexo masculino em nosso País vem sendo assinalada desde *Neiva* e *Pena* e *Parisi* (10). Não temos nenhuma explicação para esta maior incidência do megaesôfago em homens, que pode, inclusive, ser apenas aparente.

O aspecto que merece maior destaque é a elevada positividade da reação de fixação do complemento para a Doença de Chagas em nossos pacientes.

Os que não aceitam a filiação etiológica do megaesôfago e do megacolo à Doença de Chagas argumentam tratar-se de mera coincidência (32). Haveria tão sòmente superposição de duas áreas endêmicas tal como ocorre com a Doença de Chagas e o bócio endêmico, que levou Carlos Chagas a pensar na tireoidite tripanosomótica.

Contudo, *Martins, Versiani* e *Tupinambá* (25), praticando a reação de Machado Guerreiro em 28 casos de bócio encontraram apenas 5 casos positivos, ou seja 17,85%, percentual muito inferior aos encontrados nas diversas séries de megaesôfago estudadas por vários autores (4).

A incidência da tripanosomose entre as populações por outro lado, jamais alcançou cifra igual à encontrada em portadores de megaesôfago e que se aponta como mera coincidência (14), mesmo em lugares altamente infestados estudados por *Pedreira de Freitas*, onde as maiores percentagens alcançaram 70 ou 75% (22, 32).

E' óbvio que, se uma coincidência se repete sempre em tempo e lugares diferentes já não poderá ser considerada como tal e deve-se buscar a correlação existente entre os dois fatos em causa.

Em Goiás, 2 inquéritos bem conduzidos foram realizados: *Freitas* e *Mendonça* (17), em estudos realizados no município de Rio Verde, sudoeste de Goiás, em 1950, encontraram 30 reações de fixação do complemento positivas dentre 239 pessoas examinadas, o que dá uma percentagem de 12,55%.

Freitas e *Figueiredo* (18), em 40 moradores não selecionados do município de Trindade e 60 do município de Hidrolândia, encontraram respectivamente 27,5% e 13,3% infectados. Êstes algarismos estão longe do percentual de positividade que encontramos em portadores de megaesôfago — 85,9%.

Os reconhecimentos entomológicos que vêm de ser realizados pelo Departamento Nacional de Endemias Rurais, em Goiás,

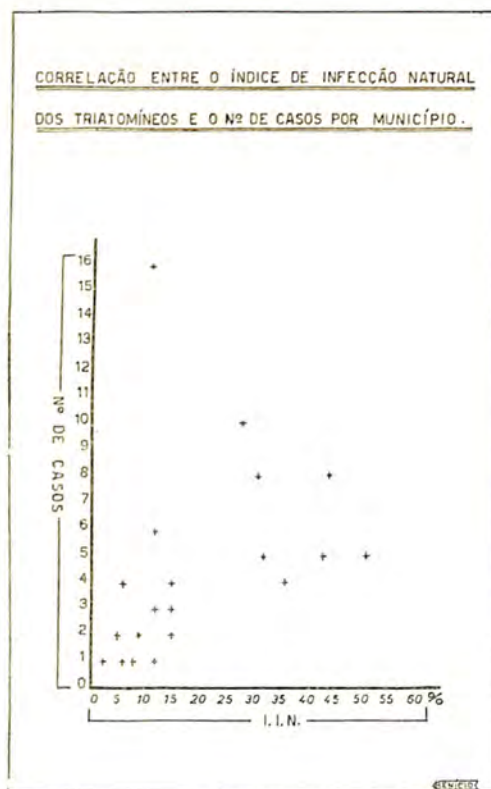



Fig. 6 — Correlação entre o índice de infecção natural dos triatomídeos e o número casos de megaesôfago, por município, dentro da série estudada.

vieram mostrar os municípios mais atingidos pela tripanosomose (7). Pudemos observar que maior número de casos de megaesôfago provêm daqueles municípios com alto índice de infecção natural dos triatomídeos, tais como Silvânia, Trindade, Itaberaí, Itauçú, Anápo-

lis, Inhumas, Formosa, etc. Existe mesmo — nìtidamente esboçada, uma correlação entre o índice de infecção natural dos triatomídeos por município e o número de casos de megaesôfago procedentes de cada município dentro da série estudada. (fig. 6)

Os aspectos eletrocardiográficos anormais encontrados em 28 portadores de megaesôfago são os habitualmente achados na cardiopatia chagásica (24,33), predominando a extrassistolia ventricular (11 vêzes) e o bloqueio de ramo direito (10 vêzes).

Dois de nossos pacientes faleceram sùbitamente antes de serem submetidos à dilatação do cárdia, ambos apresentando evidência clínica de comprometimento cardíaco.

Não encontramos em nenhum de nossos pacientes o quadro clínico da avitaminose B1. O estado de desnutrição e policarência encontrado em casos avançados, chegando à caquexia em alguns, deve-se, sem dúvida, ao déficit alimentar consequente às regurgitações, pois, os pacientes, uma vez tratados pela dilatação forçada do cárdia ou cirùrgicamente, retornam ao meio em que vivem, continuam com a mesma alimentação anterior e, apesar disso, sem qualquer medicação, recuperam pêso ràpidamente e adquirem bom estado de nutrição.

Outro fato digno de nota e fácil de ser verificado é que, numa família na qual todos têm a mesma alimentação e os mesmos hábitos de vida, sòmente o portador de megaesôfago apresenta-se com sinais de carência alimentar e avitaminoses múltiplas. Temos, além disso, surpreendido casos iniciais de megaesôfago com excelente aspecto dos pacientes.

Somos dos que acreditam, e disto estamos convencidos, de que o megaesôfago e o megacolo, no Brasil, são devidos, se não totalmente pelo menos em sua quase totalidade, à Doença de Chagas.

Os casos de megaesôfago com reação de fixação de complemento negativa não excluem a etiologia chagásica, de vez que têm sido encontrados casos de miocardite chagásica comprovada pelo achado de parasitas no coração, também com a reação de Machado Guerreiro negativa (22).

O argumento que se invoca de que o megaesôfago existe em países onde não há tripanosomose não prevalece, pois o megaesôfago deve ser considerado, e insistimos neste ponto, não como entidade nosológica de etiologia única e sim como condição mórbida capaz de ser produzida por causas diversas (21, 23). Tôda causa capaz de lesar o plexo de Auerbach e acarretar incoordenação motora ou aperistalse (3) poderá conduzir ao megaesôfago (23).

Devemos lembrar ainda que, assim como a miocardite chagásica é responsável pelo maior número de cardiopatias em nosso meio (Goiás), também o megaesôfago constitui a esofagopatia mais frequente, o que não acontece em regiões indenes daquela parasitose. Em 220 esofagopatias diagnosticadas radiològicamente de 1952 a 1955 na Santa Casa de Goiânia, 175 eram casos de megaesôfago.

Julgamos dever procurar a explicação para essa grande incidência de megas em etiologia autóctone, sem a preocupação de sua universalidade.

Os trabalhos de *Etzel* (12-15), criando a teoria da atiaminose como causa do megaesôfago, pelo seu alto valor científico, retardaram de muito o reconhecimento do vínculo etiológico existente entre megaesôfago e Doença de Chagas. Acreditamos que aquela teoria não se ajusta à realidade dos fatos clínicos, mas a verdade é que continua influindo na mente de quantos se interessam pelo estudo dêsse problema.

Para a aceitação definitiva da etiologia chagásica dos "megas" faltava-nos, como argumento final e decisivo, a base anátomo-patológica, bem como a demonstração de parasitas nas fibras musculares do esôfago ou em outra parte do tubo digestivo em casos humanos da Doença de Chagas. Os trabalhos recentes de *Koberle* e *Nador* (22) vieram trazer êsse elemento de convicção. Mostraram os citados autores que a lesão primitiva se situa na fibra muscular, sendo a destruição do plexo de Auerbach secundária ao processo inflamatório e devida a uma provável neurotoxina libertada dos tripanosomas.

Lograram ainda demonstrar, depois de exaustivas pesquisas, um pseudo-cisto de Schizotrypanum cruzi na musculatura circular do esôfago de um chagásico.

Para finalizar propomos que, ao lado das formas crônicas clàssicamente descritas da Doença de Chagas (cardíaca, nervosa e indeterminada) se considere como forma clínica individualizada, a *forma digestiva*, nela se incluindo tôdas as lesões do tubo digestivo com as consequentes alterações da sua motilidade: megaesôfago, gastropatia chagásica (22, 31), megaduodeno (20), megajejuno (20), megaíleo (32), megacolo e outras que venham a ser descritas.

Fundamentamo-nos no fato de que, clìnicamente, encontramos com grande frequência, pacientes chagásicos com manifestações digestivas exclusivas e importantes, sem sinais clínicos ou eletrocardiográficos de comprometimento do coração. São tais casos considerados como cardíacos potenciais e catalogados até agora na chamada forma indeterminada, que deve ser reservada, a nosso ver, tão sòmente para os casos totalmente assintomáticos.

RESUMO

Megaesôfago por Doença de Chagas

1) O A. estuda a relação etiológica entre Doença de Chagas e megaesôfago, mostrando ser a tripanosomose americana responsável pela grande incidência de "megas" em nosso meio.

2) A reação de Machado Guerreiro foi realizada em 85 casos de megaesôfago tomados em seleção dentre 170, encontrando-se um percentual de positividade de 85,90%.

3) Foram feitos eletrocardiogramas em 50 pacientes, dos quais 46 com reação de Machado Guerreiro positiva, encontrando-se 22 traçados normais e 28 anormais. Nestes predominaram a extrassistolia ventricular e o bloqueio de ramo direito.

4) Distribuindo-se os pacientes segundo a sua procedência, verifica-se que maior número de casos provêm daqueles municípios com alto índice de infecção natural dos triatomídeos pelo Schizotrypanum cruzi.

5) O A. propõe que se considere como forma clínica individualizada da Doença de Chagas a forma digestiva, onde seriam incluidos os pacientes com manifestações clínicas apenas do aparêlho digestivo.

SUMMARY

CHAGAS DISEASE IN THE STATE OF GOIÁS, BRASIL

Megaesophagus Caused by Chagas Disease

1) The A. studies the relationship between Chagas disease and megaesophagus and concludes that Chagas disease is responsible for the high incidence of this trouble in Brasil.
2) Machado-Guerreiro's test was performed in 85 patients with megaesophagus taken, without selection, from 170 cases, and a positivity rate of 85.90% was found.
3) Electrocardiograms were taken from 50 patients (46 of them with positive Machado-Guerreiro's test), resulting in 22 normal and 28 abnormal electrocardiograms. The latter showed predominantly ventricular premature beats and right bundle branch block.
4) Looking at the geographic distribution of the patients, it was found that the bulk of them came from areas where the triatomid bugs showed high natural infection index by Schizotrypanum cruzi.
5) The A. proposes that the digestive form be considered as an individual clinical form of Chagas disease where there would be included patients with only digestive manifestations of the disease.

BIBLIOGRAFIA

1. **Almeida Prado, A.** — Mal de engasgo ou Doença de Chagas? São Paulo Medico 1 (2): 95, 1945.
2. **Borrotchin, M.** e **Pellegrino, J.** — Provas de laboratório para o diagnóstico da Doença de Chagas e estudo eletrocardiográfico em 38 casos de megaesôfago e megacolo. Trabalho apresentado ao 1.º Congresso da Associação Médica de Minas Gerais, 1951.
3. **Brasil, A.** — Aperistalsis of the oesophagus. Rev. Bras. Gastroenterol. 7 (1): 21-44, 1955.
4. **Bulcão, J.** — Megaesôfago e Doença de Chagas. Arq. Clin. 10 (1): 34-44, 1950.
5. **Capriglione, L.** — Doença de Chagas. Arq. Clin., vol. 2, 1946.
6. **Carvalho, A. G.** e **Verano, O. T.** — Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica dos triatomídeos domiciliários e de seus índices de infecção natural pelo Schizotrypanum cruzi na região amazônica do Estado de Goiás, Brasil. Rev. Goiana Med. 2 (1): 47-59, 1956.

7. **Carvalho,** A. G. e **Verano,** O. T. — Dados não publicados.

8. **Chagas,** C. — Trypanosomiase americana. Forma aguda da molestia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 8: 37-60, 1916.

9. **Chagas,** C. e **Vilela,** E. — Forma cardiaca da trypanosomiase americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 14: 5-61, 1922.

10. **Correia Neto,** A. — Patogenia, diagnóstico e tratamento do megaesôfago (mal de engasgo). Cia. Editora Nacional, São Paulo, 1935.

11. **Cutait,** D. E. — Tratamento do megassigma pela retossigmoidectomia. Tese, São Paulo, 1953.

12. **Etzel,** E. — Neuropatologia do megaesôfago e do megacolon. Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo, 10: 383-395, 1934.

13. **Etzel,** E. — A avitaminose como agente etiológico do megaesôfago e do megacolo. Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo, 11: 59-85, 1935.

14. **Etzel,** E. — Mega-esophagus and its neuropathology: a clinical and anatomicopathological research. Guy's Hosp. Rep. 87: 158-174, 1937.

15. **Etzel,** E. — May the disease complex that includes mega-esophagus (cardiospasm), mega-colon, mega-ureter be caused by chronic vitamina B1 deficiency. Am. J. Med. Sciences, 203 (1): 87-100, 1952.

16. **Freitas,** J. L. P. — O problema da moléstia de Chagas. Rev. Paul. Med., 33 (2): 83-90, 1948.

17. **Freitas,** J. L. P. e **Mendonça,** W. — Inquérito sôbre a moléstia de Chagas no município de Rio Verde, Estado de Goiás. O Hospital, 39 (2): 251-261, 1951.

18. **Freitas,** J. L. P. e **Figueiredo,** C. — Resultados de investigações sorológicas sôbre moléstias de Chagas realizados no Estado de Goiás. Arq. Higiene e Saúde Pública, 16: 227-230, 1951.

19. **Freitas Jr.,** S. V. — Megaesôfago e megacolo no Brasil Central. Res. Clin. Científica, 19 (11): 411-424, 1950.

20. **Fonseca,** L. C. — Alguns aspectos clínico-radiológicos do intestino delgado e do colon na acalásia. Arq. Hosp. Santa Casa São Paulo, 1 (3): 179-207, 1955.

21. **Hillemand,** P. — Maladies de l'estomac, de l'oesophage e du duodenum. E. Medicales Flammarion, Paris, 1950.

22. **Koberle,** F. e **Nador,** E — Etiologia e Patogenia do megaesôfago no Brasil. Rev. Paul. Med. 47 (6): 643-661, 1955.

23. **Koberle,** F. — Patogênese dos megas. Rev. Goiana Med. 2 (2): 101-110, 1956.

24. **Laranja,** F. S., **Dias,** E. e **Nobrega,** G. — Clínica e terapêutica da Doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 46 (2): 473-529, 1948.

25. **Martins, A. V.**, **Versiani, V.** e **Tupinambá** — Estudos sôbre a moléstia de Chagas em Minas Gerais. Arq. Inst. Quim. Biológico do E. Minas Gerais, 1: 63-70, 1945.

26. **Nunan, B.**, **Rezende, C. L.** e **Canelas, A.** — Contribuição ao tema Doença de Chagas na infância. Ann. da 6.ª Jornada de Puericultura e Pediatria. Belo Horizonte, 1952.

27. **Palmer, E. D.** — The esophagus and its diseases. Paul B. Hoeber, Inc. New York, 1952.

28. **Pellegrino, J.** e **Borrotchin, M.** — Inquérito sôbre a doença de Chagas no Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 46 (2): 419-547, 1948.

29. **Pellegrino, J.** e **Rezende, C. L.** — Comentários aos trabalhos apresentados à 6.ª Jornada Brasileira de Pediatria e Puericultura sôbre o tema "Doença de Chagas na infância". Jornal de Pediatria, 17 (5): 210-223, 1952.

30. **Pinto de Castro, F.** — Alguns aspectos do diagnóstico e do tratamento do megaesôfago por acalásia do cardia. Arq. Bras. Med. 43 (9-10): 335-340, 1953.

31. **Porto, C.** — Gastropatia chagásica crônica — Nota prévia. Rev. Goiana Med. 1 (1): 43-54, 1955.

32. **Raia, A.** e **Campos, O. M.** — Megacolon. Contribuição ao estudo de sua patogenia e tratamento. Rev. Med. e Cir. de São Paulo, 15 (8): 391-560, 1955.

33. **Ramos, J.** e **Freitas, J. L. P.** e **Borges, S.** — Moléstia de Chagas. Estudo clínico e epidemiológico. Arq. Bras. Cardiologia 2 (2): 111-162, 1949.

34. **Rezende, C. L.**, **Pellegrino, J.** e **Canelas, A.** — Inquérito sôbre a Doença de Chagas em crianças internadas em Hospitais de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil). O Hospital, 43 (2): 241-250, 1953.

35. **Terracol, J.** — Les Maladies de l'oesophage. Masson & Cie., Ed. Paris, 1938.

36. **Toledo, P. A.** — Acalásia dos esfincteres. Arq. Hosp. Santa Casa São Paulo 1 (3): 151-178, 1955.

37. **Villela, E.** — A ocorrência da moléstia de Chagas nos Hospitais de Belo Horizonte e na população de seus arredores. Ann. Fac. Med. Univ. M. Gerais, 1: 1-18, 1930.

A Pesquisa Clínica no Interior do Brasil: a etiologia chagásica do megaesôfago[1]

Simone Petraglia Kropf
Programa de Pós-Graduação em História das Ciências e da Saúde
Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz

Anis Rassi
Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás

O artigo "Megaesôfago por doença de Chagas", de Joffre Marcondes de Rezende (1956), anuncia, já em seu título, o motivo pelo qual ele se tornaria uma referência fundamental para as pesquisas sobre a tripanossomíase americana: o argumento de que o "mal de engasgo" – afecção endêmica comum no interior do Brasil, que produz dificuldades na deglutição dos alimentos, popularmente conhecida como "entalo" ou "entalação" – tinha como etiologia a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Essa hipótese havia sido enunciada, sem maior aprofundamento, pelo próprio Carlos Chagas em 1916.[2] Cinqüenta anos depois, Rezende (1956) criou a denominação "forma digestiva da doença de Chagas", com base em dados epidemiológicos, clínicos, sorológicos, histopatológicos e radiológicos, nela incluindo o megaesôfago, o megacolo e todas as alterações anatômicas e funcionais secundárias à infecção pelo *T. cruzi* produzidas no sistema digestivo.

---

[1] Ambos os autores deste texto compartilham de grande admiração por Joffre Rezende. A autora o conheceu em 2001, quando colheu seu depoimento para o Programa de História Oral da Casa de Oswaldo Cruz, e o autor convive com ele há mais de cinqüenta anos, inclusive como co-autor de várias publicações sobre doença de Chagas.

[2] "Este sinal, de patogenia ainda mal esclarecida, relaciona-se talvez com a condição de disfagia conhecida pelo nome de 'mal de engasgo', endemia extensa em regiões do interior do Brasil e, segundo nossas observações, verificada principalmente naquelas zonas onde é encontrada a tripanossomíase. Será o mal de engasgo um elemento mais da tripanossomíase brasileira (...)? (...) tornam-se precisas novas pesquisas que autorizem, de modo irrecusável, incluir o mal de engasgo na sintomatologia multiforme da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*" (Chagas, 1916: 43).

Com este texto, objetivamos indicar o contexto mais amplo em que se produziu esse artigo de 1956, considerado um emblema da contribuição científica dos chamados médicos do interior para os conhecimentos sobre a doença de Chagas.[3] Além disso, pretendemos assinalar sua importância na configuração de relevante linha de pesquisa clínica, que iria demonstrar que a tripanossomíase americana, tão contestada em sua fase crônica durante a vida de Carlos Chagas, produz não apenas os distúrbios cardíacos já indicados por este, mas também problemas específicos no trato digestivo.[4]

Joffre Rezende nasceu em Piumhi, Minas Gerais, em 1921. Formou-se pela então Faculdade Nacional de Medicina da Universidade do Brasil, conhecida como Praia Vermelha, em 1950. Foi como estudante que iniciou a carreira de investigador. Merece destaque, nessa fase, a pesquisa que desenvolveu, de sua exclusiva autoria, sobre uma síndrome até então não referida na literatura médica, caracterizada por hipotensão clinostática e colapso vasomotor condicionados pelo decúbito dorsal no final da gestação, trabalho classificado em primeiro lugar no grupo Obstetrícia e Ginecologia da IV Semana de Debates Científicos (equivalente ao atual Encontro Científico dos Estudantes de Medicina/Ecem), realizada em Salvador, BA. O trabalho foi publicado em *Arquivos Brasileiros de Medicina* (Rezende, 1950) e, por ser pioneiro, constitui citação obrigatória de quantos se ocupam do assunto, no Brasil e no exterior.

Na década de 1950, a valorização da relação entre medicina e problemas sanitários do interior – que remontava ao trabalho do próprio Carlos Chagas em sua mobilização em prol do saneamento rural do país – teve como ícone os chamados Congressos Médicos do Brasil Central (Porto & Porto, 1970; Kropf, 2008). O I Congresso Médico do Triângulo Mineiro aconteceu em Uberaba, em dezembro de 1947, por iniciativa do presidente da Sociedade de Medicina local, tendo como tema principal a doença de Chagas. Dois anos depois, o evento passou a incorporar médicos de regiões vizinhas, como Goiás, assumindo a designação de Congresso Médico do Triângulo Mineiro e Brasil Central. Nesses encontros, decisivos para a afirmação profissional dos "médicos do Brasil Central" como os 'verdadeiros' conhecedores da realidade do interior do país, as endemias rurais – especialmente a doença de Chagas – eram os principais objetos de estudo.

O artigo de Rezende (1956), apresentado num desses congressos, foi publicado em outro veículo expressivo da expansão dos espaços institucionais de pesquisa sobre as endemias rurais no Brasil na década de 1950: a *Revista Goiana de Medicina* – que seria cognominada por Magarinos Torres, posteriormente, de "órgão oficioso" de divulgação da doença de Chagas. Criada em 1955 pela Associação Médica de Goiás, em um contexto de grande expectativa de progresso no estado em função dos projetos de desenvolvimento econômico para a região e dos planos para a construção da nova capital federal, a revista foi um dos principais meios para a publicação das pesquisas dos "médicos do Brasil Central", com ênfase nos problemas da patologia regional. A doença de Chagas, considerada a principal endemia de Goiás, ocupou, desde o início, proeminência em sua linha editorial. Em 1956, um número especial foi dedicado aos trabalhos dos médicos goianos apresentados ao Congresso Médico do Brasil Central acontecido em Uberaba. Em seu editorial, afirmava-se o impacto social da

[3] Sobre a importância dos médicos do interior na pesquisa sobre a doença de Chagas no Brasil, ver Kropf (2008, 2009).

[4] Sobre a história da associação entre "mal de engasgo" e doença de Chagas, ver Rezende (2001b, 2009).

enfermidade na região e louvava-se o interesse dos poderes públicos em avaliar a extensão da endemia no país e promover sua profilaxia.[5]

Foi nesse número da revista que Rezende, um de seus idealizadores e editor, publicou o trabalho que aqui comentamos. A idéia do "megaesôfago por doença de Chagas" – enaltecida nos fóruns do Brasil Central como uma das maiores contribuições de pesquisa dos médicos do interior, proporcionada por sua experiência clínica nas áreas endêmicas – provocava muitas resistências. Havia o temor de que a associação fosse reeditar o 'erro' cometido por Carlos Chagas ao vincular a tripanossomíase ao bócio endêmico. Argumentava-se que o "mal de engasgo" seria o mesmo cardioespasmo, ou "acalásia do esôfago", encontrado em regiões onde não existia a doença de Chagas. Além disso, havia as dificuldades de reconhecimento enfrentadas pelos clínicos do interior, em seu processo de afirmação profissional, em face dos tradicionais grupos de pesquisa do 'litoral'.[6]

Rezende relata que, ao iniciar suas atividades em Goiânia como médico gastroenterologia em 1954, deparou-se com grande número de pacientes que, provenientes da área rural, buscavam atendimento médico queixando-se de disfagia. O exame radiológico do esôfago demonstrava que a maioria era de casos de megaesôfago. Médicos de Uberaba já haviam reunido expressiva casuística de "mal de engasgo", constituída de doentes procedentes, em sua maioria, de Minas Gerais e Goiás.[7]

A alta prevalência do "mal de engasgo" em Goiás já era de conhecimento de Rezende, pela leitura atenta do relatório de Arthur Neiva e Belisário Penna, que percorreram esse e outros estados do interior do país em 1912, deixando minuciosa descrição do quadro nosológico da região, em que tanto a doença de Chagas quanto o "mal de engasgo" eram muito freqüentes (Neiva & Penna, 1916).[8]

Interessado em estudar a presença do megaesôfago e sua correlação com a doença de Chagas no estado, Rezende apoiou-se também nos dados do inquérito entomológico realizado em Goiás pelo Departamento Nacional de Endemias Rurais, do Ministério da Saúde (Carvalho & Verano, 1956), que apontavam a superposição da área de maior incidência do "mal de engasgo" com a que apresentava maior índice de infecção natural dos triatomíneos.

Joffre Rezende e Anis Rassi estabeleceram, no início de 1955, um protocolo de pesquisa para avaliar a relação entre a cardiopatia chagásica crônica (estudada por Rassi) e o megaesôfago. Exames de 170 pacientes forneceram, então, evidências seguras de que o "mal de engasgo" era uma das manifestações da doença de Chagas. Os achados anatomopatológicos

[5] Sobre a *Revista Goiana de Medicina*, ver Rezende (2001b). Outro aspecto importante do processo de legitimação científica e social da doença de Chagas durante a década de 1950 foi a centralidade que o tema assumiu em novos espaços institucionais de pesquisa e de ensino médico criados em regiões do interior onde a doença era endêmica, e que constituíam núcleos importantes de modernização e desenvolvimento econômico regional. Ao longo dessa década foram criadas as faculdades de Medicina de Ribeirão Preto (São Paulo), do Triângulo Mineiro e de Goiás (Kropf, 2009).

[6] Sobre as resistências à aceitação da tese da etiologia chagásica do megaesôfago, ver Rezende (2001a, 2009).

[7] Virgilio Mineiro (1958), por exemplo, apresentara ao II Congresso Médico do Triângulo Mineiro, realizado em Uberlândia em 1948, 1.514 casos por ele atendidos, dos quais 939 (62%) eram procedentes de Goiás. Dados apresentados por Rezende (2009).

[8] Sobre a repercussão do relatório de Neiva e Penna como inventário das condições sanitárias e de vida do interior do país, ver Lima (2003) e Sá (2009).

do pesquisador austríaco Fritz Koeberle (1955), na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, reforçavam as observações provenientes da pesquisa clínica.

Essa foi a base para a apresentação do trabalho de Rezende ao VIII Congresso Médico do Triângulo Mineiro e Brasil Central, realizado em Uberaba de 3 a 8 de setembro de 1956, e da subseqüente publicação na *Revista Goiana de Medicina*. Foi o primeiro trabalho em que se usou o título "Megaesófago 'por' doença de Chagas" em lugar de "Megaesôfago 'e' doença de Chagas", como era mais comum (Rezende, 1956). No artigo, além de defender a etiologia chagásica do megaesôfago, Rezende reiterou a necessidade de se reconhecer a forma digestiva como forma clínica individualizada da doença de Chagas. Esse aspecto seria aprofundado em trabalho publicado três anos depois (Rezende, 1959). O estudo de 506 casos reunidos por Rezende foi apresentado ao I Congresso Internacional sobre a Doença de Chagas, realizado no Rio de Janeiro de 5 a 11 de julho de 1959 (Rezende, 1963).

O reconhecimento da etiologia chagásica dos 'megas' viria no início da década de 1960, em especial a partir do II Congresso Mundial de Gastroenterologia, realizado em Munique, Alemanha, em maio de 1962, de cujo programa constava um simpósio internacional sobre acalásia do esôfago. O presidente do simpósio, Franz Ingelfinger, reconhecido como maior autoridade mundial em fisiologia e fisiopatologia do esôfago, declarou publicamente estar convencido do argumento de Rezende e outros pesquisadores brasileiros sobre a especificidade do megaesôfago causado pelo *T. cruzi* (Ingelfinger, 1963). A aceitação no exterior levou, paulatinamente, a que a forma digestiva da doença, estabelecida clinicamente por Rezende e esclarecida em sua patogenia por Koeberle, fosse reconhecida, no Brasil, ao longo da década de 1960, vindo a somar-se à forma cardíaca e à forma indeterminada como uma das formas crônicas da doença de Chagas.

Rezende não só soube arrolar argumentos a favor da filiação etiológica dos 'megas' à doença de Chagas, como pormenorizou o estudo de seus variados aspectos, principalmente os do megaesôfago. Epidemiologicamente, reforçou a observação da associação entre áreas triatomínicas e prevalência do megaesôfago (no Brasil, nitidamente observada na região central, que compreende parte dos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Bahia). Detalhou a sintomatologia, atribuindo-lhe o devido significado, inclusive o fisiopatológico; assim, em vários trabalhos, discorreu sobre disfagia, regurgitação, dor esofagiana, pirose, soluço, tosse seca ou produtiva, constipação intestinal, sialose, hipertrofia das glândulas salivares e desnutrição. Como outros investigadores, observou elevada sensibilidade das provas sorológicas para diagnóstico da doença de Chagas, cada vez maior com a introdução de novos métodos.[9]

Juntamente com Lauar e Oliveira (1960), descreveu a técnica radiológica para diagnóstico da aperistalsis[10] do esôfago do grupo I, que envolve o que ficou conhecido, no meio médico e na literatura, como "prova de retenção". Estabeleceu critérios para o tratamento do megaesôfago, conforme o estadiamento da afecção, com base no exame radiológico. Foi um dos pioneiros na investigação da esofagopatia chagásica ectásica e anectásica pela eletromanometria; dentre outros achados, observou que a baixa temperatura das ingestas acentuava a resposta

[9] Com a colaboração de Alejandro Luquetti, foi apurada a cifra de 93,82% de positividade entre 1.083 pacientes examinados (ver Rezende & Moreira, 2000).

[10] O termo "aperistalsis" foi criado por Aristóteles Brasil (1955) para designar todos os casos de megaesôfago, por ter observado, à manometria, ausência de peristaltismo no órgão. Cultor do vernáculo que é, Joffre Rezende adotou esse vocábulo para designar a forma anectásica (grupo I de sua classificação, no qual o órgão apresenta, como sinal de comprometimento, incoordenação motora e a consequente disfagia).

motora incoordenada do esôfago chagásico, o que explica a disfagia apenas para alimentos frios (comum nos casos de aperistalsis do grupo I) ou a acentuação da disfagia.

A grande experiência acumulada por Joffre Rezende no estudo do megaesôfago e do megacolo chagásicos foi transmitida a seus discípulos e colaboradores. Para a consolidação da existência da forma digestiva, foram especialmente relevantes as pesquisas realizadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sobre a patologia do trato digestivo na doença de Chagas, relativa às alterações motoras, secretoras e absortivas, sob a liderança de Renato Alves de Godoy (*apud* Rezende & Moreira, 2000).

A repercussão das proposições sobre a forma digestiva da doença de Chagas no exterior foi muito grande e despertou o interesse por sua identificação em países endêmicos e em países de ocorrência do megaesôfago idiopático. Estudos radiológicos levados a efeito na Argentina, Chile, Uruguai, Paraguai, Bolívia, Peru e Venezuela demonstraram a existência da forma digestiva, porém, com prevalência inferior à do Brasil, parecendo também ser mais freqüente na Argentina e no Chile o megacolo do que o megaesôfago.

As pesquisas de Joffre Rezende sobre doença de Chagas contribuíram para que o nome de Goiás cruzasse suas divisas e as fronteiras do Brasil e estimulasse a vinda para o estado, em viagens de estudos, de muitos investigadores, inclusive estrangeiros, entre os quais Franz Ingelfinger, dos EUA, notável conhecedor da patologia esofagiana; Norbert Henning, da Alemanha, presidente do II Congresso Mundial de Gastroenterologia; Zdenek Fejfar, sueco a serviço da Organização Mundial da Saúde; J. N. P. Davies, dos EUA, que descreveu a fibrose endomiocárdica em Uganda; o argentino Cecilio Romaña, que descreveu o sinal que leva seu nome como "porta de entrada" da infecção pelo *T. cruzi*; Otto Hernandez Pieretti, da Venezuela, pioneiro em eletrocardiografia dinâmica (Holter) na cardiopatia chagásica crônica; Franklin Neva, do National Institute of Health dos EUA; Gabriel A. Schmuñis e Alvaro Moncayo, da Organização Mundial da Saúde.

As pesquisas médicas feitas no Brasil Central, assim, não apenas completaram o quadro clínico da tripanossomíase americana, tal como é universalmente aceito, mas contribuíram, de modo decisivo, para a projeção e o reconhecimento internacional dos estudos sobre a doença de Chagas e, num sentido mais amplo, da própria ciência brasileira.

REFERÊNCIAS

BRASIL, A. Aperistalsis of the esophagus. *Revista Brasileira de Gastroenterologia*, 1: 21-44, 1955.

CARVALHO, A. G. & VERANO, O. T. Epidemiologia e profilaxia da doença de Chagas em Goiás. *Revista Goiana de Medicina*, 2: 241-266, 1956.

CHAGAS, C. Tripanossomíase americana: forma aguda da moléstia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 8(2): 37-60, 1916.

INGELFINGER, F. J. *Annals of 2nd World Congress of Gastroenterology*. Panel discussion, 1963, p. 45.

KOEBERLE, F. & NADOR, E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Revista Paulista de Medicina*, 47: 643-661, 1955.

KROPF, S. P. En busca de la enfermedad del Brasil: los médicos del interior y los estudios sobre el mal de Chagas (1935-1956). *In*: CARBONETTI, A. & GONZALEZ-LEANDRI, R. (Orgs.) *Historias de Salud y Enfermedad en América Latina, Siglos XIX y XX*. Cordoba: Universidad Nacional de Cordoba, Conicet, 2008.

KROPF, S. P. *Doença de Chagas, Doença do Brasil: ciência, saúde e nação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2009.

LIMA, N. T. Viagem científica ao coração do Brasil: nota sobre o relatório da expedição de Arthur Neiva e Belisário Penna à Bahia, Pernambuco, Piauí e Goiás. *Revista da Fundação Museu do Homem Americano*, 1(3): 185-215, 2003.

MINEIRO, V. Contribuição à etiologia do megaesôfago: distribuição geográfica. *Revista Goiana de Medicina*, 4: 29-34, 1958.

NEIVA, A. & PENNA, B. Viagem científica pelo norte da Bahia, sudoeste de Pernambuco, sul do Piauí e de norte a sul de Goiás. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 8(3): 74-224, 1916.

PORTO, C. & PORTO, C. C. História do megaesôfago nos Congressos Médicos do Brasil Central. *Revista Goiana de Medicina*, 16(1/2): 117-136, 1970.

REZENDE, J. M. Pressão arterial e pulso no final da gestação: hipotensão clinostática e colapso vasomotor condicionados pelo decúbito dorsal. *Arquivos Brasileiros de Medicina*, 40(11-12): 375-414, 1950.

REZENDE, J. M. Megaesôfago por doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina*, 2: 297-314, 1956.

REZENDE, J. M. Forma digestiva da moléstia de Chagas. *Revista Goiana de Medicina*, 5: 193-227, 1959.

REZENDE, J. M. Alterações do tubo digestivo na moléstia de Chagas. *In*: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE A DOENÇA DE CHAGAS, I, 1959, Rio de Janeiro. *Anais*... Rio de Janeiro, 1963. v. IV.

REZENDE, J. M. Obstáculos ao reconhecimento da etiologia chagásica do megaesôfago e megacólon endêmico: uma visão histórica. *In*: REZENDE, J. M. de. *Vertentes da Medicina*. São Paulo: Giordano, 2001a.

REZENDE, J. M. Revista Goiana de Medicina, 30 anos. *In*: REZENDE, J. M. de. *Vertentes da Medicina*. São Paulo: Giordano, 2001b.

REZENDE, J. M. Viagem científica de Neiva e Penna: roteiro para os estudos das doenças do sertão. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, 16, supl. 1, Chagas do Brasil: ciência, saúde e sociedade, jul. 2009.

REZENDE, J. M. & MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. *In*: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. & BARRAL NETTO, M. (Eds.). Trypanosoma cruzi *e Doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

REZENDE, J. M.; LAUAR, K. M. & OLIVEIRA, A. R. de. Aspectos clínicos e radiológicos da aperistalsis do esôfago. *Revista Brasileira de Gastroenterologia*, 12: 247-262, 1960.

SÁ, D. M. Uma interpretação do Brasil como doença e rotina: a repercussão do relatório médico de Arthur Neiva e Belisário Penna (1917-1935). *História, Ciência, Saúde – Manguinhos*, 16, supl. 1, Chagas do Brasil: ciência, saúde e sociedade, jul. 2009.

Megaesôfago por Doença de Chagas

Sonia Gumes Andrade
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz

Em uma fase do conhecimento da doença de Chagas em que ainda não se haviam traçado os limites entre o papel do parasito nas diversas manifestações mórbidas da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e as interpretações equivocadas das manifestações digestivas da doença,

o trabalho do dr. Joffre de Rezende, publicado em 1956, veio trazer a palavra de um clínico extremamente cuidadoso, o qual, vivenciando o problema em sua prática diária e mantendo o contato indispensável com outros clínicos da mesma área endêmica do Brasil Central, pôde estabelecer correlações importantes.

Duas importantes coincidências ocorreram: a primeira chamava a atenção para a alta incidência de megas do aparelho digestivo no estado de Goiás e a segunda demonstrava a superposição entre a área de distribuição dos megas do aparelho digestivo e a presença de quadros mórbidos da doença de Chagas na sua forma cardíaca, com alterações eletrocardiográficas típicas.

Embora a reação de fixação de complemento, que à época era a reação de Guerreiro e Machado, permitisse um bom diagnóstico da infecção chagásica, aventava-se a possibilidade de que seria apenas uma coincidência a alta incidência de positividade desta reação observada nos pacientes com megas do aparelho digestivo, o que se constituiria, segundo os adeptos desta teoria, em um fato semelhante ao observado por Chagas quando atribuiu à infecção pelo *T. cruzi* a grande incidência de bócio no Brasil Central.

Por outro lado, surgiram também trabalhos de cunho investigativo, de Eduardo Etzel, na década de 30 e em 1952, atribuindo à desnutrição e às avitaminoses, principalmente de vitamina B1, importante papel no desenvolvimento dos megas do aparelho digestivo. Esses trabalhos foram citados pelo dr. Rezende, que lhes faz uma justa crítica, devido ao fato de que "retardaram de muito o vínculo etiológico existente entre megaesôfago e doença de Chagas".

O trabalho do dr. Joffre de Rezende mostra a simplicidade e a coerência do clínico que sabe reconhecer os quadros nosológicos predominantes em sua área e interpretá-los à luz dos conhecimentos adquiridos com a observação diária dos seus pacientes, ao tempo que questiona sobre a patogênese da doença. No seu trabalho de coletar, organizar e interpretar os casos clínicos, confirma a alta positividade das reações sorológicas em mais de 80% dos casos de megas estudados.

Na mesma época em que Rezende redigiu seu artigo, surgiram os trabalhos de Fritz Köberle e Estevão Nador, que descreveram em Ribeirão Preto, SP, lesões do plexo de Auerbach no tubo digestivo e a presença de parasitos nas fibras musculares (Köberle & Nador, 1955). Ele assim se referiu ao evento: "Para a aceitação definitiva da etiologia chagásica dos megas, faltava-nos, como argumento final e decisivo, a base anatomopatológica, bem como a demonstração de parasitas nas fibras musculares do esôfago e em outras partes do tubo digestivo em casos humanos da doença de Chagas. Os trabalhos recentes de Koberle e Nador vieram trazer este elemento de convicção". Sua preocupação em esclarecer a patogênese da forma digestiva da doença de Chagas reflete o seu espírito científico e a sua capacidade de aplicar os conhecimentos no esclarecimento dos casos clínicos.

Todas as suas observações o levaram a propor, nesse artigo de 1956, a forma digestiva como uma forma clínica individualizada, nela incluindo as lesões do tubo digestivo com a conseqüente alteração de sua motilidade.

O dr. Joffre de Rezende mantém essa linha de estudos até o presente e continua contribuindo para o melhor conhecimento dos megas do aparelho digestivo.

REFERÊNCIAS

ETZEL, E. Neuropatologia do megaesôfago e do megacólon. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, 10: 383-395, 1934.

ETZEL, E. A avitaminose como agente etiológico do megaesôfago e do mecacolo. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, 11: 59-85, 1935.

ETZEL, E. Mega-esophagus and its neuropathology: a clinical and anatomicopathological research. *Guy's Hospital Reports*, 87: 158-174, 1937.

ETZEL, E. May the disease complex that includes mega-esophagus (cardioespasm), mega-colon, mega-ureter be caused by chronic vitamina B1 deficiency? *American Journal of the Medical Sciences*, 203(1): 87-100, 1952.

KÖBERLE, F. & NADOR, E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Revista Paulista de Medicina*, 47(60): 643-661, 1955.

Zigman Brener

Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 3(1): 43-49, 1961.

Zigman Brener (1928-2002)

Médico nascido em São Paulo, produziu intensamente em quimioterapia e imunologia. Por mais de trinta anos chefiou o Laboratório de Doenças de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(1):43-49, janeiro-fevereiro 1961.

CDU 616.937.3-092.9-085
:547.722.5

ATIVIDADE TERAPÊUTICA DO 5-NITRO-FURALDEÍDO-SEMICARBAZONA (NITROFURAZONA) EM ESQUEMAS DE DURAÇÃO PROLONGADA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Z. BRENER

RESUMO

A presença de um ciclo sangüíneo do *T. cruzi* e a existência de drogas capazes de destruir um grande número ou a totalidade das formas circulantes do parasito, sugere a possibilidade teórica de erradicação dêsse tripanosoma através da manutenção de uma concentração ativa da substância tripanosomicida por tempo suficientemente longo no sangue, a fim de que a eliminação contínua das formas sangüícolas leve à exaustão do parasitismo.

A fim de testar essa possibilidade foi usado o 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona), administrado por via oral na dose de 100 mg/kg durante 53 dias consecutivos. Em 65 camundongos assim tratados os métodos laboratoriais de contrôle empregados (exame de sangue fresco, subinoculação, xenodiagnóstico, cultura e exame histológico do coração), realizados 1 a 2 meses após o tratamento, demonstraram a persistência da infecção em apenas 3 animais. Cinco animais tratados a partir do dia seguinte à inoculação e posteriormente reinoculados apresentaram típica fase aguda da infecção indicando ausência de imunidade por desaparecimento da infecção.

Em 10 camundongos que receberam apenas 20 doses da droga a persistência de tripanosomas fôi assinalada em 8 animais.

INTRODUÇÃO

Apesar da existência de vários medicamentos ativos contra as formas sanguícolas do *T. cruzi*, não se obteve ainda uma droga capaz de curar com regularidade a doença de Chagas experimental ou humana. Entre os compostos usados destacam-se o Bayer 7602 (Ac) ou 3024 (I.C.I.), o Bayer 9736 (As), o sulfato de carbidium, a primaquina, alguns nitrofuranos e, mais recentemente, o aminonucleosídeo da Stilomicina isolado ou associado com a primaquina (MAZZA, COSSIO & ZUCCARDI [5]; MAZZA, BASSO & BASSO [4]; GOODWIN, GOSS & LOCK [3]; PIZZ [9]; FERNANDES, PEREIRA & PEREIRA DA SILVA [2]; MORAES, LOPES FARIA & FERNANDES [6]; PACKCHANIAN [7]).

No presente trabalho estudamos a ação do 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (PACKCHANIAN [7]) administrado segundo esquemas de duração prolongada, na infecção experimental do camundongo pelo *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação dos animais — Camundongos albinos pesando 18-20 g eram inoculados, por via intraperitoneal, com cêrca de 70.000 tripanosomas da amostra Y (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG [11]). Para obtenção do inóculo, camundongos eram sangrados no 8.º dia de infecção, sendo a contagem de

Instituto Nacional de Endemias Rurais. Centro de Pesquisas de Belo Horizonte.

BRENER, Z. — Atividade terapêutica do 5-nitro-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):43-49, 1961.

tripanosomas feita segundo a técnica descrita por PIZZI [11] com algumas modificações.

Tratamento — A nitrofurazona apresenta-se sob a forma de um pó amarelado pouco solúvel na água e no éter, mas solúvel em álcool e propileno-glicol. A administração era feita sempre por via oral por meio de sonda estomacal ligada a seringa, sendo a droga suspensa em água destilada na presença de goma arábica.

Os seguintes esquemas de administração da droga foram usados:

a) em 65 animais a nitrofurazona, na dose de 100 mg/kg, foi administrada durante 53 dias consecutivos a partir do 4.º dia de infecção. Em todos os animais o exame de sangue a fresco, feito antes do início da medicação, revelou tripanosomas no sangue circulante.

b) Em 15 animais a droga foi administrada na mesma dose de 100 mg/kg durante 53 dias consecutivos, sendo a medicação iniciada no dia seguinte à inoculação. Em 10 animais tomados como contrôles e infectados com o mesmo inóculo a parasitemia foi assinalada a partir do 5.º dia de doença, tendo a infecção decurso normal que terminou com a morte dos camundongos.

c) Em 15 animais a nitrofurazona foi dada na dose de 100 mg/kg durante 20 dias consecutivos, a partir do 4.º dia de inoculação. Também neste grupo a presença de parasitos foi demonstrada pelo exame de sangue a fresco de todos os animais, realizado antes do início do tratamento.

CONTRÔLE DA ATIVIDADE TERAPÊUTICA

Exame de sangue a fresco — A partir do dia seguinte ao início da medicação foram feitos exames de sangue a fresco entre lâmina e lamínula com sangue colhido da cauda do animal. Os exames eram feitos diàriamente ou em dias alternados, sendo examinados no mínimo 100 campos microscópicos com médio aumento. Êsses exames se estenderam até a 10.ª semana após a inoculação.

Subinoculação — Camundongos tratados foram sacrificados em épocas variáveis entre 1 e 2 meses após o fim do tratamento. Os animais eram anestesiados e, de cada um, cêrca de 0,4-0,6 ml de sangue citratado eram colhidos por secção da veia axilar e injetados intraperitonealmente em dois outros camundongos pesando 14-16 g. Exames de sangue a fresco dêsses animais eram feitos diàriamente uma ou duas vêzes por dia, a partir do 5.º dia após a inoculação, até os 30 dias quando os exames passavam a ser feitos em dias alternados. A pesquisa microscópica de parasitos se estendia até pelo menos a 6.ª semana após a inoculação.

Cultura — Nos animais sacrificados para a subinoculação, parte do sangue colhido era semeado em meio de ágar-sangue, tomando-se o cuidado de também semear sangue de camundongos contrôles não tratados. Em algumas ocasiões fragmentos de coração e baço foram também semeados para pesquisa ulterior de flagelados.

Xenodiagnóstico — Em 20 camundongos tratados foi feito o xenodiagnóstico. Os animais eram anestesiados, imobilizados e deixados sugar por 4 ninfas de triatomíneos até a sua morte por anemia. A pesquisa de formas metacíclicas no conteúdo retal dos "barbeiros" era feita entre 45 a 50 dias após o repasto sanguíneo.

Reinoculação — Em alguns camundongos tratados com 53 doses foi feita a reinoculação de formas sanguícolas do *T. cruzi* após 10 semanas de exame a fresco repetidamente negativo. A fim de acompanhar o decurso da infecção foram feitas contagens diárias de tripanosomas segundo a técnica de PIZZI [11] ligeiramente modificada.

Exame histológico — Em todos os animais sacrificados foram feitos exames de cortes histológicos do coração corados pela hematoxilina-eosina para pesquisa de "ninhos de leishmânia". Em alguns animais, fragmentos do intestino delgado, estômago e baço foram também examinados para pesquisa de parasitos.

RESULTADOS

No Quadro I estão expostos os resultados obtidos em 45 camundongos tratados a partir do 4.º dia de inoculação com 100 mg/kg

BRENER, Z. — Atividade terapêutica do 5-nitro-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):43-49, 1961.

QUADRO I

Resultados obtidos em 45 camundongos tratados com 100 mg/kg de nitrofurazona, por via oral, durante 53 dias consecutivos. Em apenas dois animais foi possível comprovar, nos exames realizados 1 a 2 meses após o tratamento, a persistência da infecção chagásica.

Nº	Exame a fresco (4º dia)	Exame de sangue a fresco (Semanas após tratamento)										Cultura (sangue)	Pesquisa de parasitos (músculo cardíaco)	Subinoculação em camundongos (exame de sangue a fresco) Semanas após inoculação					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6
1	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
13	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
26	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
27	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
28	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
31	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
32	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
33	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
34	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
35	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
36	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
37	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
38	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
39	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
40	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
41	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—
42	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
43	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
44	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—

BRENER, Z. — Atividade terapêutica do 5-nitro-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):43-49, 1961.

de nitrofurazona administrados durante 53 dias consecutivos. Em apenas 2 animais a subinoculação foi positiva, tendo sido negativos os demais exames.

No Quadro II estão expostos os resultados do xenodiagnóstico em 20 camundongos tratados, a partir do 4.º dia de inoculação, com 53 doses consecutivas de 100 mg/kg de nitrofurazona. Em 19 animais o xenodiagnóstico e os demais métodos laboratoriais resultaram negativos e em apenas 1 camundongo o xenodiagnóstico foi positivo.

Em 15 camundongos medicados também com 100 mg/kg da droga durante 53 dias, mas nos quais a medicação foi iniciada no dia seguinte à inoculação, o exame de sangue a fresco foi repetidamente negativo durante todo o tempo de observação. Cinco camundongos dêsse grupo foram reinoculados, 50 dias após o fim do tratamento, com 80.000 tripanosomas por via intraperitoneal. Foram feitas contagens diárias dos tripanosomas no sangue periférico, observando-se o

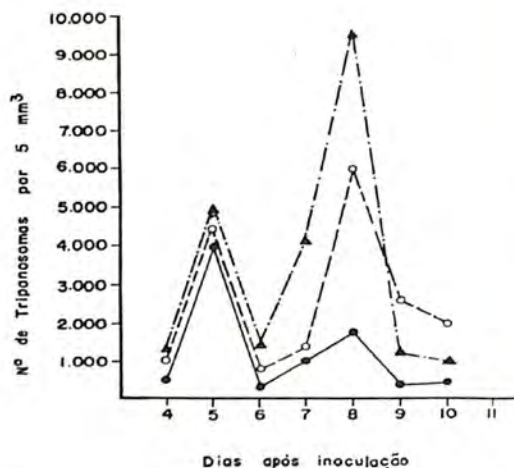



Fig. 1 — Resultado da reinoculação em 3 camundongos tratados com nitrofurazona (100 mg/kg, via oral), a partir do dia seguinte à inoculação deu origem a típica fase aguda.

QUADRO II

Resultados obtidos em 20 camundongos tratados com nitrofurazona na dose de 100 mg/kg, por via oral, durante 53 dias consecutivos. Em apenas um animal o xenodiagnóstico foi positivo.

Nº	Exame a fresco (4º dia)	Exame de sangue a fresco (Semanas após tratamento)										Xeno-diagnóstico	Cultura		Pesquisa de parasitos (músculo cardíaco)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		baço	coração	
1	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
9	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

BRENER, Z. — Atividade terapêutica do 5-nitro-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):43-49, 1961.

aparecimento de nítida fase aguda com grande número de tripanosomas circulantes. Na fig. 1 estão expostas as curvas de parasitemia obtidas em 3 dos animais tratados e reinoculados.

Finalmente, no Quadro III, estão representados os resultados da subinoculação de sangue dos 10 animais tratados com apenas 20 doses contínuas de 100 mg/kg de nitrofurazona. Como se pode observar, em apenas dois dos animais sacrificados a subinoculação foi negativa, resultando positiva nos demais.

tem, atualmente, drogas capazes de destruir um grande número ou a totalidade das formas circulantes do *T. cruzi* sugerem a possibilidade teórica de erradicação do parasito se se conseguir manter uma concentração ativa da droga no sangue por tempo suficientemente longo a fim de que a eliminação contínua das formas sanguícolas leve à exaustão da infecção.

No presente trabalho essa possibilidade foi investigada com o emprêgo da nitrofurazona. Essa droga apresenta, para êsse tipo de investigação, as seguintes vantagens: co-

QUADRO III

Resultados obtidos em 10 camundongos tratados com 20 doses consecutivas de nitrofurazona na dose de 100 mg/kg, via oral. Observar que em 8 dos 10 animais houve persistência da infecção chagásica.

Nº	Exame a fresco (4º dia)	Exame de sangue a fresco (Semanas após o tratamento)						Subinoculação em camundongos (Exame de sangue a fresco) Semanas após a inoculação					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
3	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
5	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
6	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
7	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
8	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
9	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
10	+	—	—	—	—	—	—	—	+				

DISCUSSÃO

Certos aspectos do ciclo evolutivo do *T. cruzi* fazem supor que tôdas ou pelo menos a grande maioria das formas flageladas libertadas dos tecidos circulam por algum tempo no sangue antes de penetrarem em novas células. A possibilidade de que tripanosomas oriundos dos tecidos possam penetrar por contigüidade em novas células, sem cumprir um ciclo sanguíneo, existe, mas ainda não foi cabalmente comprovada. A presença do ciclo sanguíneo e o fato de que exis-

mo demonstrou Packchanian [7], a nitrofurazona apresenta nítida ação supressiva destruindo as formas circulantes; aplicada em dose única, a droga ainda está presente no sangue circulante de camundongos após 24 horas (Packchanian [7]); estudos levados a efeito por Paul & col.[8] demonstraram que a nitrofurazona, como vários outros nitrofuranos, não se acumula ao nível dos tecidos, pois é ràpidamente degradada por todos êles com exceção do sangue; a droga apresenta baixa toxicidade e, aparentemente, discreta ação cumulativa, já que a mortalidade, após

BRENER, Z. — Atividade terapêutica do 5-nitro-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):43-49, 1961.

50 doses consecutivas de 100 mg/kg (equivalente a 1/5 do LD50), foi apenas de 12,5%.

Os resultados apresentados tendem a confirmar o raciocínio aqui exposto, já que, entre todos os animais tratados, apenas em 3 foi possível assinalar a persistência dos tripanosomas. Uma objeção aparente quanto à cura dos animais seria a possibilidade da persistência de "ninhos de leishmânia" viáveis, nos tecidos, por um prazo superior àquele da observação por nós realizada. O desconhecimento de certos dados biológicos essenciais do ciclo vital do parasito leva-nos a considerar êsse fato, embora êle nos pareça pouco provável.

A possibilidade de os métodos laboratoriais de contrôle empregados apresentarem uma sensibilidade insuficiente para detectar infecções com um número pequeno de parasitos também pode ser argüida, mas é preciso lembrar que, em nossa experiência, empregando inúmeras drogas ativas em tipos diferentes de esquemas, êsses métodos foram repetidamente capazes de demonstrar a persistência da infecção. O fato de que reinoculações, levadas a efeito em animais nos quais o tratamento foi iniciado no dia seguinte à inoculação, tenham produzido infecções tìpicamente agudas fala a favor de um não desenvolvimento da imunidade por desaparecimento da infecção. Em animais que foram tratados a partir do 4.º dia de infecção, quando os tripanosomas já se apresentam em número razoável no sangue, as reinoculações foram sempre positivas embora não se tenham obtido altas parasitemias; êstes casos sugerem a persistência de anticorpos protetores.

A ação direta sôbre as formas intracelulares parece-nos também pouco provável em vista dos fracos resultados obtidos com o esquema de 20 doses.

Na experiência de Packchanian [7], a nitrofurazona mostrou-se dotada sòmente de poder supressivo, sem erradicar a infecção. Embora até 42 doses do medicamento tenham sido aplicadas, não há dados seguros sôbre a continuidade na administração do medicamento. Segundo Packchanian [7] — "each drug was administered intra-peritoneally in its highest tolerance dose once or twice daily until all the untreated control animals were dead. Daily or weekly therapy of the surviving mice was continued using the same dosage until the animals died or until the acute fatal infection was diverted to a chronic or a latent form".

Considerando os resultados obtidos, seria altamente desejável o emprêgo de esquemas de longa duração com outras drogas ativas contra as formas circulantes.

Tendo em vista a existência de estudos farmacológicos detalhados em relação à nitrofurazona (Krantz & Evans) e o fato de que êsse composto já tem sido empregado em indivíduos com tripanosomíase africana (Evans, Niemegeers & Packchanian [1]), justifica-se, ao nosso ver, o seu uso em casos humanos de doença de Chagas.

SUMMARY

Therapeutic activity of 5-nitro-2-furaldehyde-semicarbazone (nitrofurazone) in protracted schemes upon mice experimentally infected through Trypanosoma cruzi.

Considering the existence, in the life cicle of *T. cruzi*, of circulating blood forms, and their susceptibility to certain drugs, an attempt was made to treat experimental Chagas disease following a long-term schedule of drug administration. A complete exhaustion of the parasite strain was expected to occur, despite the inefficacy of the drug against the tissue forms.

Nitrofurazone (5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone) was given orally in doses of 100 mg/kg. Fifty three running doses, beginning on the 4th day of infection, were given to 65 mice, 87.5% of which survived and were sacrificed 1 to 2 months after treatment. The laboratory methods used for assessing the drug activity (microscopical blood examination, blood inoculation from the treated mice to young uninfected ones, xenodiagnosis, culture, histological examination) revealed the presence of trypanosomes in only 3 of the treated animals. Reinoculation of 5 infected mice that had been treated since the next day after inoculation resulted in typical acute infection, which indicates a complete absence of immunity

BRENER, Z. — Atividade terapêutica do 5-nitro-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):43-49, 1961.

REFERENCIAS

1. EVANS, F.; NIEMEGEERS, K. & PACKCHANIAN, A. — Nitrofurazone therapy of *Trypanosoma gambiense* sleeping sickness in man. Am. J. trop. Med. & Hyg. **6**:665-678, 1957.

2. FERNANDES, J. F.; PEREIRA, J. P. M. & PEREIRA DA SILVA, L. H. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. IV. Effect of the aminonucleoside of Stylomycin on mouse infections. Exptl. Parasit. **8**:496-501, 1959.

3. GOODWIN, L. G.; GOSS, M. D. & LOCK, J. A. — The chemotherapeutic action of phenanthridine compounds. III. Carbidium ethanesulphonate. Brit. J. Pharmacol. & Chemoth. **5**:287-305, 1950.

4. MAZZA, S.; BASSO, G. & BASSO, R. — Ensayos terapeuticos del producto 9736 (As) Bayer y de su acción comparada con el 7602 (Ac) Bayer en la enfermedad de Chagas. Mis. Est. Patol. reg. argent. **61**:3-81, 1942.

5. MAZZA, S.; CASSIO, R. & ZUCCARDI, E. — Primer caso agudo grave de enfermedad de Chagas comprobado en Tucuman y su tratamiento con Bayer 7602 (Ac). Mis. Est. Est. Patol. reg. argent. **32**:3-18, 1937.

6. MORAES, G. E. S.; LOPES FARIA, J. & FERNANDES, J. F. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. V. Effects of primaquine, stylomycin derivatives and analogs, on experimentally infected mice. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **2**:147-154, 1960.

7. PACKCHANIAN, A. — Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofuran compounds. Antib. & Chemoth. **1**: 13-23, 1957.

8. PAUL, M. F.; PAUL, H. E.; BENDER, R. C.; KOPKO, F.; HARRINGTON, C. M.; ELLS, V. R. & BUZARD, J. A. — Studies on the distribution and excretion of certain nitrofurans. Antib. & Chemoth. **10**:287-302, 1960.

9. PIZZI, T. — Effect of primaquine on experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Proc. Soc. exper. Biol. & Med. **78**:643-644, 1951.

10. PIZZI, T. — Inmunologia de la enfermedad de Chagas. Universidade de Chile, Santiago, 1957.

11. SILVA, L. H. P. da & NUSSENZWEIG, V. — Sôbre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia clin. & biol. **20**:191-208, 1953.

Recebido para publicação em 5 novembro 1960.

Contribuição do Estudo de Zigman Brener (1961) para a Terapia da Doença de Chagas

Solange Lisboa de Castro
Departamento de Ultra-Estrutura e Biologia Celular
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Maria de Nazaré Correia Soeiro
Departamento de Ultra-Estrutura e Biologia Celular
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Álvaro José Romanha
Instituto René Rachou/Fiocruz

Em abril de 1909, uma nova tripanossomíase restrita ao continente americano foi descoberta. Nesse feito, considerado sem precedente na história da ciência, o brilhante cientista de Manguinhos, Carlos Justiniano Chagas Ribeiro, descreveu o parasito, o *Trypanosoma cruzi*, o inseto triatomíneo transmissor, os reservatórios naturais (animais silvestres), além de várias características clínicas da doença de Chagas. Esta doença apresenta duas fases consecutivas, aguda e crônica, nas quais o coração é o principal alvo de infecção e inflamação (Elizari, 1999). No ano em que comemoramos o centenário de sua descoberta, contabilizamos importantes ganhos, resultantes principalmente da expressiva redução no número de novos casos da doença. A redução decorreu de medidas profiláticas de controle das duas principais vias de transmissão dessa parasitose, a vetorial e a transfusional. Tais medidas foram fruto de uma decisão política continental apoiada pelos países do Cone Sul – Brasil, Chile, Argentina e Uruguai – afetados por essa doença silenciosa, progressiva e altamente incapacitante, que diminui a qualidade de vida e a força de trabalho de milhões de pessoas, podendo resultar na morte dos pacientes (Dias, Prata & Correia, 2008; Moncayo & Ortiz-Yanine, 2006). Contudo, diante das características epidemiológicas da doença de Chagas, faz-se necessário expandir e sustentar tais esforços, por meio da consolidação de ações de saúde pública, mantendo ativa vigilância entomológica, identificando focos residuais e garantindo a manutenção da interrupção da transmissão vetorial e transfusional. Por outro lado, neste momento é

também relevante destacar que, apesar dos avanços alcançados, inclusive quanto ao melhor entendimento da biologia do parasito, de seus hospedeiros e de seus peculiares mecanismos de interação, sérios desafios devem ainda ser enfrentados, incluindo aqueles relacionados às graves limitações observadas na terapia disponível para essa doença, que atinge cerca de 12-14 milhões de pessoas em regiões pobres de 18 países da América Latina (Dias, 2007). De fato, os poucos recursos destinados ao desenvolvimento de novas drogas (Hotez *et al.*, 2004) e a falta de interesse por parte das indústrias farmacêuticas são decorrentes, principalmente, da demanda restrita a populações de áreas carentes, não havendo, portanto, garantia do retorno de investimentos em bases puramente comerciais (Trouiller *et al.*, 2002).

Assim, após cem anos da descoberta da doença de Chagas, no balanço entre os ganhos alcançados e os presentes desafios, artigos científicos clássicos que contribuíram para um melhor entendimento dessa patologia e de seu controle são revisitados, como faremos nesta breve revisão relacionada a contribuições e desdobramentos sobre seu tratamento a partir do trabalho de Zigman Brener, publicado em 1961 na *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* sob o título "Atividade terapêutica do 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*".

HISTÓRICO

Praticamente desde a sua descoberta, o tratamento da doença de Chagas vem sendo alvo de intenso estudo. Como registrado por Coura e Cançado (2009), a busca de drogas para uso clínico pode ser dividida em três períodos: de 1909 a 1934, entre a descoberta da doença e a morte de Carlos Chagas, pouquíssimos estudos foram relatados; de 1935 a 1960, diversos compostos foram testados sem que houvesse drogas eficientes; o terceiro período, o mais produtivo, teve início em 1961 com a publicação dos estudos do dr. Brener, que introduziu o esquema de tratamento de longa duração e consolidou os critérios de avaliação terapêutica no modelo murino.

Estudos de drogas anti-*T. cruzi* até a década de 1960

Nesse período, o tratamento de infecções por outros tripanossomatídeos estava adiantado em relação ao tratamento para doença de Chagas (Hawking, 1973). Os antimoniais, utilizados no tratamento da leishmaniose, e os arsenicais aromáticos, na tripanosomíase africana, não foram eficazes contra o *T. cruzi* (Goble, 1961; Brener, 1975). Como relatado por Coura e Cançado (2009), entre 1936 e 1960 várias classes de compostos foram testadas, porém sem resultados positivos ou conclusivos. No tratamento de pacientes chagásicos foram testados antibióticos, como a penicilina (Mazza, Basso & Basso, 1945; Talice, 1945; Laranja, Dias & Nóbrega, 1948), anfotericina B (Abitbol *et al.*, 1964), a puromicina (estilomicina) (Meira *et al.*, 1954), bem como as 8-aminoquinoleínas, primaquina e 349C59 (Howard *et al.*, 1957; Pizzi, Niedman & Jarpa, 1963; Rassi & Siqueira, 1974), a bisquinaldina-cruzon (Bay 7602; ICI3024) (Mazza, Basso & Basso, 1945), o arsenical espirotripan (Bay 10557) (Romaña, 1953), a fenantridina, o sulfato de carbídeo (74C48) (Barros & Nogueira, 1951), a piperamida (Macedo *et al.*, 1975) e o niridazol (Prata, Machado & Macedo, 1966).

Uma classe de compostos bastante estudada no período foi a dos nitrofuranos (revisto em Brener, 1966 e em Cançado & Brener, 1979). Em 1952, Packchanian iniciou um estudo sistemático sobre a atividade tripanocida de 52 nitrofuranos, e em 1957 identificou entre quatro novos compostos ativos *in vivo* a nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona-

furacin). O autor reportou que esse nitrofurano evitava a morte dos animais infectados e tratados, porém a infecção persistia na fase crônica. Em ensaios utilizando cultura de células HeLa, foi observada atividade de nitrofurazona sobre formas intra e extracelulares (Mieth & Seidenhat, 1937). A utilização de culturas de embrião de pinto infectados com *T. cruzi* mostrou atividade variável de algumas drogas: de furazolidona (N-(5-nitro-2-furfurilideno)-3-amino-2-oxazolidinona) (Bayles, Waitz & Thompson, 1966), furaltadona (N-(5-nitro-2-furfurilideno)-3-amino-5-(N'-morfolinilmetil-2-oxazolidinona, NF-902) e furadantina (N-(5-nitro-2-furfurilideno)-hidantoína sódica) (Brener, 1966). Em 1961, no mesmo ano da publicação do artigo sobre nitrofurazona, Brener relatou na revista *Hospital* a atividade de furazolidona, furadantina e furaltadona em esquemas de tratamento por cinqüenta dias de camundongos infectados, com os seguintes percentuais de cura: 86,7, 50,0 e 7,2%, respectivamente (Brener, 1961b). Na análise do coração de camundongos infectados e tratados com nitrofurazona por microscopia eletrônica, foram observadas alterações citoplasmáticas e nucleares (Brener, Tafuri & Almeida-Maria, 1969). Furaltadona foi também efetiva *in vivo* na sua forma -dextro, levógira e racêmica (Moon & Coleman, 1962; Seneca, Peer & Reagan, 1964).

Diante desse cenário de poucas perspectivas para a descoberta de uma droga, foi decisiva a sabedoria do grande cientista. Ele partiu da hipótese de que

> A presença de um ciclo sangüíneo do *T. cruzi* e a existência de drogas capazes de destruir um grande número ou a totalidade das formas circulantes do parasito, sugere a possibilidade teórica de erradicação deste tripanossoma através da manutenção de uma concentração ativa da substância tripanossomicida por tempo suficientemente longo no sangue, a fim de que a eliminação contínua das formas sangüícolas leve à exaustão do parasitismo.

Brener abriu novas e concretas possibilidades para o tratamento dos milhões de pacientes chagásicos. De fato, até 1961 o tratamento de camundongos experimentalmente infectados era realizado por curtos períodos, sendo os resultados expressos apenas pela redução de parasitemia, mortalidade e duração da fase aguda. Como bem colocou Rassi (1982),

> Brener imaginou que empregando tais substâncias por tempo suficientemente longo, poderia conseguir a erradicação por exaustão parasitária, pois com a destruição contínua das formas sangüíneas, não se formariam as teciduais, em virtude da ruptura do ciclo 'localização celular do parasito – sangue – nova localização celular'. Poder-se-ia, assim contornar a ineficácia dos medicamentos sobre as formas teciduais, uma vez que, indiretamente, estas estariam sendo atingidas.

Nesse estudo conduzido por Brener em 1961, camundongos não isogênicos infectados com $7x10^4$ formas sanguíneas da cepa Y e com parasitemia positiva, foram submetidos a esquemas de 20 e 53 dias de tratamento com 100mg/kg de nitrofurazona administrada por via oral. O conjunto dos dados parasitológicos avaliados por até dois meses pós-tratamento incluiu não somente a mortalidade, a curva parasitêmica, mas também o parasitismo tissular, além de aspectos de cura parasitológica como subinoculação, hemocultura, xenodiagnóstico e reinoculação. Os resultados confirmaram a hipótese levantada: enquanto 100% dos animais não tratados morreram em decorrência da infecção, não houve morte no grupo tratado com a nitrofurazona, e observou-se persistência da parasitemia (hemocultivo, subinoculação e xenodiagnóstico) somente em 4,4% dos animais tratados por 53 dias. Por outro lado, a administração da nitrofurazona por somente vinte dias resultou em apenas 20% de cura parasitológica dos animais infectados e tratados, demonstrando claramente o sucesso do tratamento com a nitrofurazona quando empregado em esquemas de longa duração. Brener argumenta que, apesar da sua evidente ação supressiva, a nitrofurazona não se acumularia

nos tecidos (Paul *et al.*, 1960), requerendo administração prolongada para permitir a contínua exposição à droga dos parasitos liberados na corrente sangüínea após ruptura das células hospedeiras. A ação direta sobre as formas intracelulares parece pouco provável, haja vista a ineficácia observada durante o tratamento por somente vinte dias. É importante destacar que os critérios de avaliação da eficácia do tratamento da nitrofurazona utilizados por Brener são parâmetros parasitológicos ainda hoje utilizados para o monitoramento da atividade de compostos anti-*T. cruzi* sobre modelos experimentais.

Finalmente, Brener argumenta que, "Tendo em vista a existência de estudos farmacológicos detalhados em relação à nitrofurazona (Krantz e Evans) e o fato de que esse composto já tenha sido empregado em indivíduos com tripanossomíase africana (Evans, Niemeeger e Packchanian) justifica-se, ao nosso ver, o seu uso em casos humanos de doença de Chagas".

Os estudos clínicos com nitrofurazona foram realizados em pacientes nas fases aguda e crônica (revisto em Coura & Cançado, 2009). Ferreira, Prata e Rassi (1963) trataram dez casos agudos da doença com nitrofurazona; em cinco deles foi observada falha terapêutica, pelo xenodiagnóstico. Em outro estudo clínico realizado com pacientes crônicos, Coura e colaboradores (Coura *et al.*, 1961; Coura, Ferreira & Silva, 1962) trataram 14 pacientes com nitrofurazona, tendo sido o tratamento interrompido em cinco deles devido aos efeitos colaterais observados, como intensa polineuropatia sensitiva, além de anorexia, com perda de peso e parestesias. De outros seis pacientes tratados por mais de cinqüenta dias, observou-se que dois foram considerados curados, com base na negativização do xenodiagnóstico e da reação de Guerreiro-Machado. Em 1964, Cançado e colaboradores trataram cinco pacientes crônicos com nitrofurazona, tendo o tratamento sido interrompido entre o 10º e o 34º dias, também em função do aparecimento de polineuropatia sensitiva periférica (Cançado, Marra & Brener, 1964). Por fim, Cançado e Brener (1979) reportam que "sendo tóxica e destituída de ação curativa nas condições do ensaio, nitrofurazona deveria ceder lugar a outros derivados nitrofurânicos em futuros ensaios terapêuticos na forma crônica da doença de Chagas".

Estudos de drogas anti-*T. cruzi* após publicação de Brener em 1961

Entre 1960 e 1970, dois novos nitroderivados, nifurtimox (nitrofurano) e benznidazol (nitroimidazol), foram introduzidos na quimioterapia da doença de Chagas. O nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) mostrou-se o mais ativo, entre diversos derivados 5-nitrofurfurilidenos testados (Bock, Gonert & Haberkorn, 1969), sendo comercializado pela Bayer com o nome de Lampit, em comprimidos contendo 120 mg do princípio ativo. Já o benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) foi sintetizado por Wineholt e Liebman (revisto em Tavares, 1986) e inicialmente comercializado pela Roche com o nome de Rochagan, em comprimidos contendo 100 mg do princípio ativo; atualmente é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe), incluindo formulações pediátricas.

O relativo sucesso de nifurtimox e benznidazol encorajou a pesquisa de outros nitro-heterocíclicos, mas muitos já se mostraram menos potentes em modelos experimentais. Dados recentes também têm fortemente sugerido que a cura terapêutica de animais cronicamente infectados possa ser alcançada mediante o tratamento por longos esquemas de tratamento com benznidazol (Bustamante, Bixby & Tarleton, 2008). Por outro lado, nifurtimox e benznidazol apresentam sérias limitações principalmente relacionadas à toxicidade e aos variáveis resultados de acordo com a fase da doença, a duração do tratamento, a idade dos pacientes e a área geográfica (Coura, 2007). De fato, foram relatados diferentes perfis de suscetibilidade aos nitrofuranos entre cepas de *T. cruzi* (Brener &

Chiari, 1967; Brener, Costa & Chiari, 1976). Ambos os nitroderivados apresentam eficácia na fase aguda e crônica recente da doença, alcançando níveis de até 80% de cura nas doses de 8 a 10 mg/kg/dia com nifurtimox e de 5 a 7,5 mg/kg/dia com benznidazol, durante sessenta a noventa dias de terapia. No entanto, na fase crônica ambas as drogas alcançam somente de 10 a 20%, de acordo com as áreas geográficas (revisto em Coura & Castro, 2002 e Cançado, 2002), o que, somado à resistência natural observada em vários isolados do parasito, reforça a necessidade de identificar novos compostos que possam vir a substituí-los. Novos compostos têm sido investigados e relatados em recentes revisões sobre o tema (Urbina, 2001; Linares, Ravaschino & Rodriguez, 2006; Soeiro & Castro, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a introdução do benznidazol e do nifurtimox, ensaios clínicos só foram reportados no caso de alopurinol e dos azóis itraconazol e fluconazol (Coura & Castro, 2002). De fato, nenhuma droga que alcançou o estágio de ensaios clínicos na doença de Chagas foi considerada segura, completamente eficaz, conveniente ou de baixo custo para uso em larga escala. Nessas circunstâncias, a descoberta de compostos alternativos, ou mesmo substitutos para os compostos usados atualmente, apresenta-se como uma área de pesquisa de grande interesse e urgente devido ao impacto social e econômico que teria a cura dessa tripanossomíase, principalmente dos casos crônicos. Como observado por Brener em seu artigo de 1961, considerando os resultados obtidos com a nitrofurazona, o uso de esquemas de longa duração com outras drogas ativas contra as formas circulantes, mas com baixa retenção tissular, pode também representar uma estratégia eficaz para a identificação de novas terapias para a doença de Chagas. Como exposto por Cançado (2002), "na doença crônica de longa duração o *T. cruzi* persiste nos tecidos, após o tratamento, na grande maioria dos doentes tratados, escapando à ação do medicamento e mantendo positivos os testes sorológicos". Assim, é possível supor que o sucesso do tratamento de pacientes crônicos, em que se observa persistência do parasitismo intracelular subpatente e baixos níveis parasitêmicos circulantes, demanda também a disponibilidade e retenção de compostos ativos nos tecidos, mas que apresentem baixa toxicidade.

REFERÊNCIAS

ABITBOL, H. *et al.* Acción terapéutica de la anfotericina B en la enfermedad de Chagas aguda. *Boletín Chileno de Parasitología*, 19: 132-134, 1964.

BARROS, O. M. & NOGUEIRA, D. P. Caso agudo de moléstia de Chagas: tratamento com nova droga. *Revista Clínica de São Paulo*, 27: 11-18, 1951.

BAYLES, A.; WAITZ, J. A. & THOMPSON, P. E. Growth of *Trypanosoma cruzi* in cultures of chick embryo and effects of furazolidone and tris-(p-aminophenyl) carbonium chloride. *The Journal of Protozoology*, 13: 110-114, 1966.

BOCK, M.; GONERT, R. & HABERKORN, A. Studies with Bay 2502 on animals. *Boletín Chileno de Parasitología*, 24: 13-19, 1969.

BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 3: 43-49, 1961a.

BRENER, Z. A atividade terapêutica da furaltadona, furazolidona e furadantina na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *O Hospital*, 60: 947-951, 1961b.

BRENER, Z. Chemotherapeutic studies in tissue cultures infected with *Trypanosoma cruzi*: the mode of action of some active compounds. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 60: 445-451, 1966.

BRENER, Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. *In*: *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*. New York: Academic Press, 1975. v. 13.

BRENER, Z. & CHIARI, E. Suscetibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 9: 197-207, 1967.

BRENER, Z.; COSTA, C. A. G. & CHIARI, C. A. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 18: 450-455, 1976.

BRENER, Z.; TAFURI, W. L. & ALMEIDA-MARIA, T. An electron microscope study of *Trypanosoma cruzi* intracellular forms in mice treated with an active nitrofuran compound. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 11: 245-249, 1969.

BUSTAMANTE, J. M.; BIXBY, L. M. & TARLETON, R. L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med*, 14: 542-550, 2008.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44: 29-37, 2002.

CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. Terapêutica. *In*: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. (Eds.). Trypanosoma cruzi *e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

CANÇADO, J. R.; MARRA, M. D. & BRENER, Z. Ensaio terapêutico clínico com a 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) na forma crônica da doença de Chagas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6: 16, 1964.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – a background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 113-122, 2007.

COURA, J. R. & CANÇADO, J. R. A história da terapêutica da doença de Chagas. Disponível em: Portal Doença de Chagas, <http://www.fiocruz.br/chagas>. Acesso em: 26 maio 2009.

COURA, J. R. & CASTRO, S. L. de. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 3-24, 2002.

COURA, J. R.; FERREIRA, L. F. & SILVA, J. Experiências com a nitrofurazona na fase crônica da doença de Chagas. *O Hospital*, 62: 957-964, 1962.

COURA, J. R. *et al*. Tentativa terapêutica com a nitrofurazona na fase crônica da doença de Chagas. *O Hospital*, 60: 425-429, 1961.

DIAS, J. C. P. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cadernos de Saúde Pública*, 23, supl.: S13-S22, 2007.

DIAS, J. C. P.; PRATA, A. & CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41: 193-196, 2008.

ELIZARI, M. V. Chagasic myocardiopathy: historical perspective. *Medicina (B Aires)*, 59, supl. 2: 25-40, 1999.

EVANS, F.; NIEMERGEERS, K. & PACKCHANIAN, A. Nitrofurazone therapy of *Trypanosoma gambiense* sleeping sickness in man. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6: 665-678, 1957.

FERREIRA, H. O.; PRATA, A. & RASSI, A. Administração prolongada de nitrofurazona no tratamento da doença de Chagas aguda. *O Hospital*, 63: 1.391-1.396, 1963.

GOBLE, F. C. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 51: 439-449, 1961.

HAWKING, F. Chemotherapy of trypanosomiasis. *In*: SCHNITZER, R. J. & HAWKING, F. (Eds.). *Experimental Chemotherapy*. New York: Academy Press, 1973. v. IV.

HOTEZ, P. J. *et al*. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 871-878, 2004.

HOWARD, J. E. *et al*. Enfermedad de Chagas congenita. *Boletín Chileno de Parasitologia*, 12: 42-45, 1957.

LARANJA, F. S.; DIAS, E. & NÓBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 46: 473-529, 1948.

LINARES, G. E. G.; RAVASCHINO, E. L. & RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 13: 335-360, 2006.

MACEDO, V. *et al*. CL 71.366 1-(3-dimetialaminopropil)-4-(*p*-metoxifenil) dihidro cloridrato de piperazina no tratamento da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 9: 263-266, 1975.

MAZZA, S.; BASSO, G. & BASSO, R. Investigaciones sobre la enfermedad de Chagas. Contribuición para la terapéutica de la enfermedad de Chagas. Ultimos ensayos quimioterapicos: M. 3024 ICI. Aplicación de penicilina. *Misión de Estudios de Patologia Regional de la Argentina (Mepra)*, 70: 1-8, 1945.

MEIRA, J. A. *et al*. Tratamento de casos agudos da doença de Chagas por meio de puromicina (ex. acromicina). *Revista Brasileira de Medicina*, 11: 829-831, 1954.

MIETH, H. & SEIDENHAT, H. Chemotherapeutische Untersuchungen an *Trypanosoma cruzi* in der Gewebekultur. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 18: 53-60, 1937.

MONCAYO, A. & ORTIZ-YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100: 663-677, 2006.

MOON, A. P. & COLEMAN, J. F. The activity of dextro-, levo- and racemic furaltadone against infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Boletín Chileno de Parasitologia*, 17: 63-66, 1962.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas' disease with nitrofuran compounds. *The Journal of Parasitology*, 38: 30-32, 1952.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas' disease with nitrofuran compounds. *Antibiotics Chemother*, 7: 13-23, 1957.

PAUL, M. F. *Et al*. Studies on the distribution and excretion of certain nitrofurans. *Antibiotics Chemother*, 10: 287-302, 1960.

PIZZI, T. P.; NIEDMANN, G. & JARPA, A. Comunicación de tres casos de enfermedad de Chagas aguda producidos por infecciones accidentales de laboratorio. *Boletín Chileno de Parasitologia*, 18: 32-36, 1963.

PRATA, A.; MACHADO, R. & MACEDO, V. Treatment of schistosomiasis mansoni with a new nitrothiazole derivative, CIBA 32644-Ba. *Acta Tropica*, supl. 9: 180-186, 1966.

RASSI, A. Tratamento etiológico da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 38: 277-281, 1982.

RASSI, A. & SIQUEIRA, H. Tentativa de tratamento etiológico da doença de Chagas com o composto 349C59. CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, X, 1974.

SENECA, H.; PEER, P. M. & REAGAN, J. W. Chemotherapy of experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice with l-furaltadone. *Experimental Parasitology*, 15: 479-484, 1964.

SOEIRO, M. N. & DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13: 105-121, 2009.

TALICE, R. Ensayos de tratamiento de la forma aguda de la enfermedad de Chagas por la penicilina. *Archivos Uruguayos de Medicina*, 27: 152-157, 1945.

TAVARES, W. *Manual de Quimioterápicos Antiinfecciosos*. Rio de Janeiro: Ateneu, 1986.

TROUILLER, P. *et al*. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *The Lancet*, 359: 2.188-2.194, 2002.

URBINA, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 14: 733-741, 2001.

Fritz Köberle

Chagas' disease and Chagas' syndromes:
the pathology of American trypanosomiasis.
Advances in Parasitology, 6: 63-116, 1968.

Fritz Köberle (1910-1983)

Médico austríaco, naturalizado brasileiro, descobriu o mecanismo neurogênico da fase crônica da doença de Chagas, conceituando a moléstia como uma enfermidade do sistema nervoso autônomo.

Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis

FRITZ KÖBERLE

Faculty of Medicine of Ribeirão Prêto, University of São Paulo, Brazil

I. Introduction

Advance in our knowledge of American trypanosomiasis during the last fifteen years has reoriented this illness from an exotic and rare disease into the most frequent and dangerous plague of the American continent, "which contains an estimated minimum of 7 million infected individuals" (WHO Report,

1962). One may suppose that this *minimum* does not express the actual reality, because more than 80% of these persons acquired the infection during their early years of life, i.e. many years ago. However, in many areas where Chagas' disease is still endemic, poor conditions of life have not changed essentially during recent decades. In fact, we are informed that in Santiago del Estero, N. Argentina, more than 200 cases of acute Chagas' disease were recorded during six recent months (October 1966–March 1967) (Rohwedder, 1967). Thus, Chagas' disease is still a real and serious problem "in several aspects, including the socio-medical" (WHO Report, 1962).

This account of the pathology of American trypanosomiasis is based mainly upon personal material derived from nearly 1000 autopsy cases and several hundred biopsies. The pathology of the infection here discussed represents the aspects of the American trypanosomiasis seen in Central Brazil.

The history of Chagas' disease is full of unnecessary and disagreeable polemic which I do not wish to reawaken. Therefore, I will avoid quarrels and shun meaningless discussion of different opinions which ran contrary to my interpretation, because many former opponents now agree with my concepts.

The differences of opinion are based on marked regional variations in manifestations of *T. cruzi* infection. I do not know the causes of those variations, and it would be profitable to study them and to explain the various aspects of Chagas' disease.

It seems to me that the polymorphic form of Chagas' disease in Central Brazil represents the illness in *all* its multiple and variable facets.

II. Periods in the History of Chagas' Disease

Chagas' disease—like all really great and important discoveries—has its own and very peculiar history, called by Magalhães (1944) a "tragicomedy, which embittered and destroyed the life of one of our greatest compatriots". In this history it is useful to distinguish the following six periods.

A. Discovery

Chagas in 1908 discovered in the intestine of the blood-sucking triatomas—which were common in the primitive huts of the Brazilian hinterland—an unknown trypanosome, which he named "*Schizotrypanum cruzi*" in honour of his teacher. The presence of this parasite in bugs suggested to him the possible existence of an infectious disease in animals and man. Soon afterwards he also found the parasites in the blood of domestic animals (dogs and cats) and in the blood of a sick child with a high temperature (1909). Two years later—in August, 1911—he reported his discoveries to the "Academia Nacional de Medicina" (Rio de Janeiro) in a precise description of the acute and chronic phases of the disease as well as of its different forms, repeatedly calling his discovery a "new realm in Pathology". Among several publications which appeared later, there is an outstanding report on more than 200 cases of the so-called central nervous system form (Chagas, 1913).

B. DENIAL

However, this important discovery by Chagas was violently combated and even denied, probably because it passed the comprehension of Chagas' contemporaries. The campaign became intensified when Kraus (1915) could not find any human case of Chagas' disease in N. Argentina, although a great number of infected bugs were found in hut dwellings. Chagas rejected Kraus' report but the attacks and doubts against his discovery continued, and he was called "a man who searches in the jungle for diseases which do not exist".

C. OBLIVION

After 1920, Chagas' disease was simply forgotten and for more than 10 years it disappeared from Nosology as an infectious disease of public health importance.

D. "REDISCOVERY"

Mazza (1934) reported many acute cases of Chagas' disease found in N. Argentina, exactly where Kraus failed to find any human case of this disease. Like Chagas, Mazza was criticized for "discovering new diseases instead of treating the many already existing ones", but he and his colleagues persisted in their investigations and were able to record more than 1 000 acute cases before 1944, stressing the importance of the disease as a Public Health problem. Due to Mazza's research, investigations on once forgotten Chagas' disease were reinstated in South America.

E. MUTILATION

Although the disease became recognized as both real and important after Mazza's "rediscovery", it emerged much changed from the original description. The concept became limited to the "chronic cardiac form" called "chronic chagasic myocarditis". The remaining forms described by Chagas were almost all discarded. Even so it was considered a rare disease because, until 1944, 45 cases of chronic chagasic myocarditis were recorded in Brazil and, until 1948, only 134 outside this country (Laranja, 1954).

F. REHABILITATION

The real significance of this plague was proved as a result of improvements introduced in the technique of the complement fixation test (Davis, 1943; Freitas and Almeida, 1949) and its wide application, and also through the new concept on the pathogenesis of American trypanosomiasis (Köberle, 1956). Nowadays Chagas' disease is no more an "odd exotic parasitic disease" but the commonest infectious disease in South America, representing, as Chagas wrote in 1918, a "problem of highest importance of the American continent".

It is now realized that Chagas was completely right in predicting his discovery as "a new realm in Pathology", and it is just this new area which will be discussed in this review.

III. General Pathology of *Trypanosoma cruzi* Infection

A. TRANSMISSION AND PORTAL OF ENTRY

The possibilities of human infection are listed below.

1. *Infection through contaminated feces of* Reduviidae

After the blood-sucking act (chiefly on exposed regions of the body during the night) the bug expels semiliquid contaminated feces, plus the metacyclic forms of the trypanosomes, near the wound of the bite. As the wound itches, scratching follows and the contaminated feces are rubbed into the small puncture produced by the insect or into an abrasion of the skin, reaching the subcutaneous tissues. Or the parasites may penetrate even through the intact mucous membranes, commonly the ocular conjunctiva. These are by far the most usual sites of infection.

2. *Diaplacentar infection of the fetus*

This kind of infection was first clinically reported by Dao (1949), pathologically confirmed by Gavaller (1951) and further recognized by many other observers.

3. *Infection through the maternal milk*

Infection through the maternal milk was only once reported (Mazza *et al.*, 1936).

4. *Infection through blood transfusion*

This is a very important mode of transmission (Freitas *et al.*, 1952), as blood donors in endemic areas are frequently infected.

5. *Infection through other contaminated insects*

Contaminated insects other than triatomas (mosquitoes, bedbugs, and ticks) may infect animals (Brumpt, 1913; Mayer and Rocha Lima, 1914; Alcântara, 1966).

6. *Infection in laboratory*

Infection in the laboratory is accidental, and fortunately a rare event.

B. PRIMARY FOCUS AND PRIMARY COMPLEX

The infection is generally acquired during the first years of life and it usually has a more severe development in infants than in adults. Both sexes are equally infected (Viana Martins *et al.*, 1940; Laranja *et al.*, 1948; Romaña, 1963).

Once introduced into the connective tissue of the skin or mucous membrane, the parasites cause a circumscribed local inflammatory reaction, and through lymphatic propagation, almost simultaneously, elicit an acute regional lymphadenitis. This primary complex develops after a short incubation period

about one week, and lasts for approximately one month. Rarely, an exulcer-
on occurs at the site of the primary lesion.
In most cases the portal of entry is the ocular conjunctiva. The unilateral
ema, conjunctivitis and pre-auricular lymphadenitis are known as Romaña
n (Fig. 1).

FIG. 1. Romaña sign. (By courtesy of Professor J. L. Pedreira de Freitas.)

C. GENERALIZATION

Soon after the formation of the primary complex, even during the first or
ond week of infection, the parasites penetrate into the blood stream, pro-
cing a septicemic state, with hematogenic metastatization. Any kind of cell
y be parasitized (Vianna, 1911; Mayer and Rocha Lima, 1914) but the
iscle and glia cells are specially invaded.

D. LOCAL REACTIONS

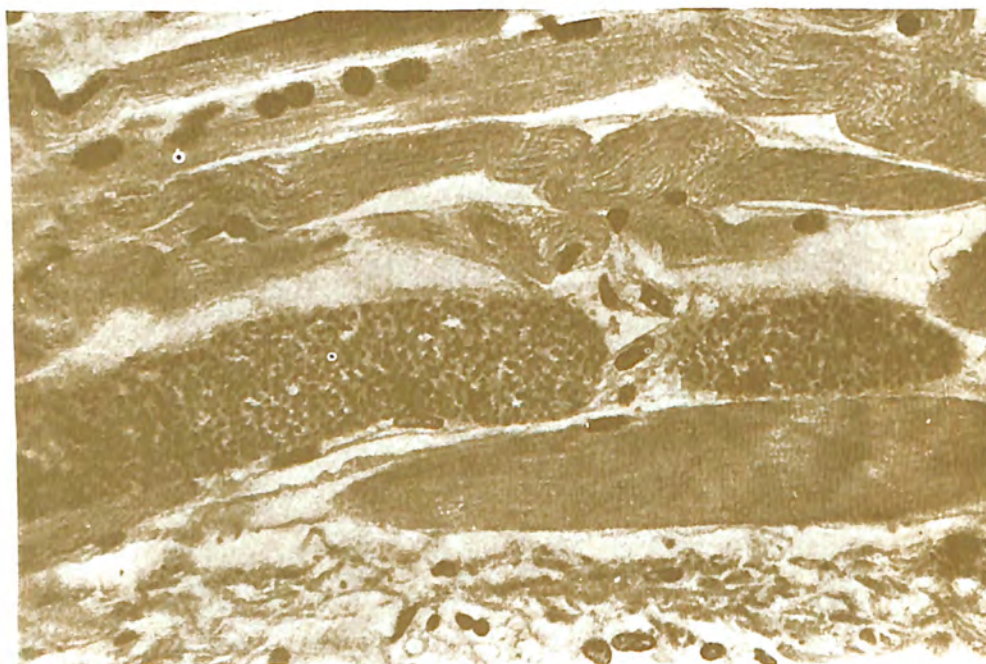
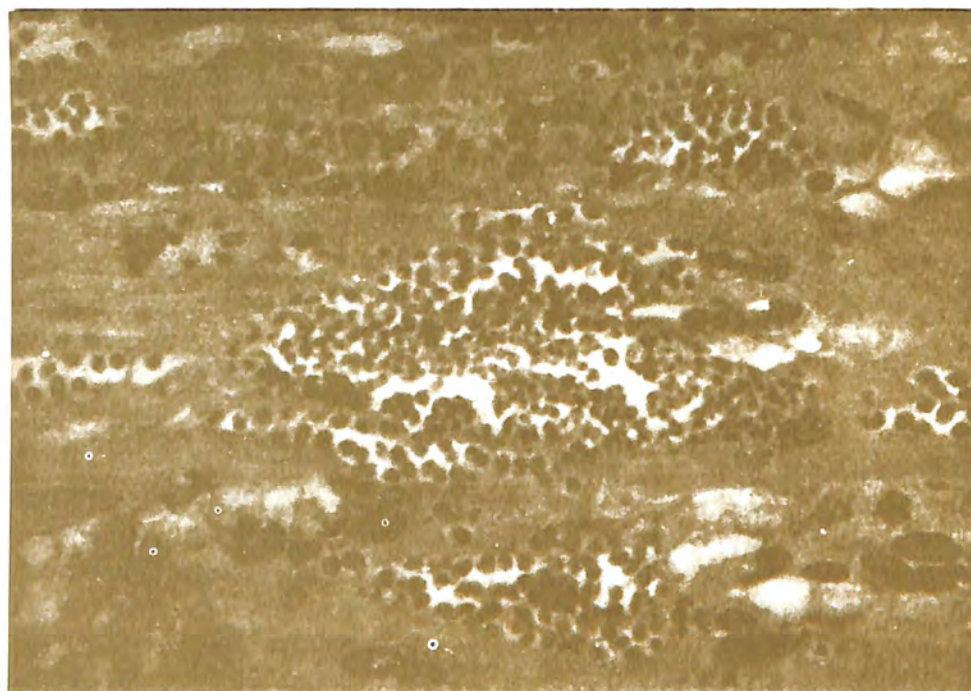
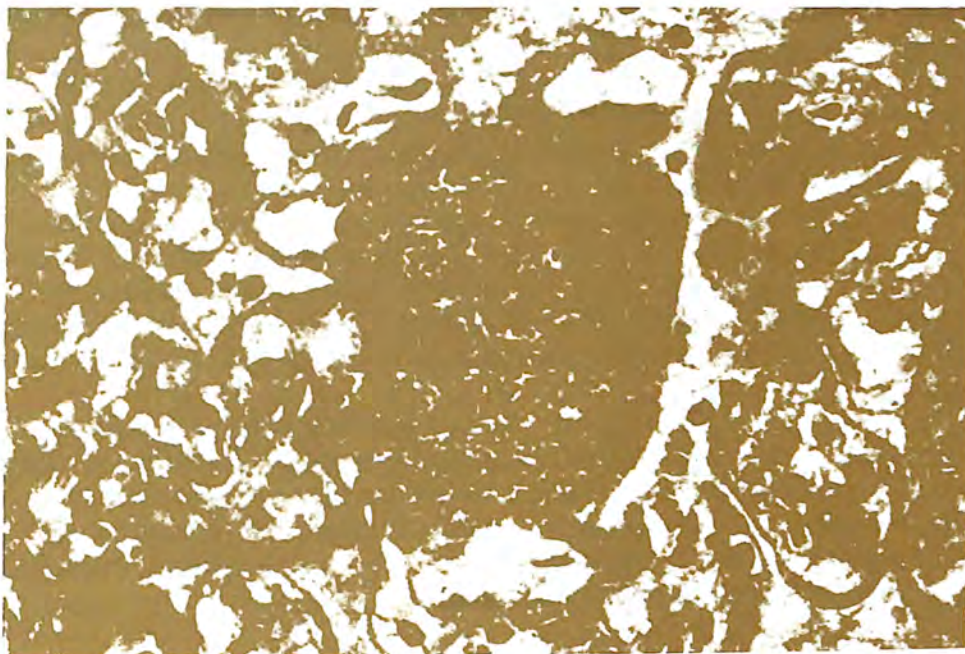
In the evolutionary cycle of *T. cruzi* in man, two different forms are distin-
shed: (a) the trypanosome or blood form and (b) the leishmania or intra-
lular form.

A

B

FIG. 2. A, B and C (facing page). Parasitism of human tissues in acute *T. cruzi* infection. A—Striated muscle fibers of the esophagus. B—Heart muscle. C—Placenta.

C

The trypanosomes circulate in the blood stream and after a certain period of time, invade the tissue cells. We do not know (1) how long the trypanosomes can or must circulate in the blood stream, (2) for what reason the parasites leave the circulation, and (3) how they select preferentially the muscle and glia cells. As the trypanosome needs carbohydrates for its survival, it seems likely that a product originating from its metabolism reaches the blood, acting as a trigger which informs the parasite of the proximity of a cell containing glycogen. Certain investigations indicate that the trigger information is received as soon as the parasite enters the venous circulation. It is at this level that the trypanosome leaves the capillary, actively perforating its wall and finally the plasmatic membrane of the host cell, entering by its posterior end (opposite to the free flagellum) (Kollert, 1960). At this posterior end of the trypanosome a vesicle is present (Meyer *et al.*, 1958) which probably contains an enzymatic substance capable of promoting lysis of the plasmatic membrane of the host cell, facilitating penetration. Once in the interior of the host cell the trypanosome transforms immediately into the intracellular leishmania form. Binary division follows and the parasite multiplies during a period of 5 days (Romaña and Meyer, 1942; Kollert, 1960) in a cyst-like cavity (pseudocyst) within the invaded cell (Fig. 2).

Mayer and Rocha Lima (1912) observed that the development of the leishmania forms within the host cell is uniform. However, in the final phase, before the transformation into trypanosomes occurs, a slight difference in size appears among the parasites and at the same time a small amount of fluid accumulates inside the pseudocyst. This feature was recently confirmed by electronmicroscopy (Tafuri, 1967). This fluid seems to originate from the intracellular

material after liquefaction through enzymatic substances derived from the parasites. The presence of a certain amount of liquid is apparently necessary for the early maturing mobile forms of the parasite. This final stage of transformation from the leishmania to trypanosome forms is variable and never occurs simultaneously in all the parasites inhabiting a pseudocyst. Usually only a small fraction of the parasites reach complete maturity, and as soon as this occurs they leave the pseudocyst using their non-flagellated pole to perforate the cell membrane. Very rarely there is a simultaneous transformation of leishmania forms into trypanosomes. As soon as the first trypanosome has burrowed from the pseudocyst the transformation of leishmania into trypanosome ceases due to the entrance of interstitial fluid into the ruptured pseudocyst. All leishmania forms not yet transformed into trypanosomes are non-viable outside the pseudocyst and ultimately disintegrate (Romaña and Meyer, 1942).

The two described forms of parasites act differently during the disease. The trypanosomes which leave the pseudocyst and penetrate into the blood stream, are destined to maintain the infection, burrowing into new host cells, where the intracellular cycle is reinstated; the leishmania forms, not yet transformed into trypanosomes, remain in the vicinity of the ruptured pseudocyst, disintegrate and become responsible for the local lesions.

1. *Inflammatory reactions*

Inflammatory reactions are detected in the vicinity of the ruptured pseudocyst, but they have different features and characteristics according to the state of development of the disease.

In the acute phase the cellular infiltrates consist of neutrophils and sometimes almost exclusively of eosinophils. As the disease progresses there is a decrease of polymorphonuclears and a gradual increase of monocytes, lymphocytes and plasma cells. Later on there appear histiocytes which are transformed into epithelioid cells, sometimes multinucleated giant cells of the Langhans type. According to the modification of the cellular components there is also a corresponding change in the patterns of the infiltration. The infiltrates are always localized around the ruptured pseudocysts but in the acute phase they show a certain tendency to propagation associated with the presence of a leucomonocytory reaction without sharp demarcation. The inflammatory foci may show confluence, giving the impression of a diffuse phlegmonous infiltration which may make it difficult to recognize the primary multifocal origin. As the quantity of monohistiocytes rises, chiefly when epithelioid and giant cells increase in number during the chronic phase of the disease, there is a distinct delimitation of the inflammatory reaction, resulting finally in the formation of granulomas (Fig. 3A, B).

As occurs in other so-called specific inflammations, we also find in the *T. cruzi* infection inflammatory reactions in accordance to the immunobiological state of the parasitized organism. This condition of the organism, through the production of antibodies, is responsible for the pattern, composition and extent of the inflammatory response. However, Chagas' disease does not produce

peculiarities of the inflammatory reactions from the standpoint of the principles of general pathology.

During the acute phase, with a high parasitemia and accentuated parasitism of the different tissues (or organs), the inflammatory foci are extremely frequent and impressive, while in the chronic phase they are extremely few and small, their detection calling for careful examination of many histological sections.

The evolution of the acute septicemic phase toward the chronic pauciparasitic phase results from the mobilization of the specific defense of the host, establishing an immunobiologic equilibrium between the micro- and the macro-organism. We can imagine that in Chagas' disease, as in other chronic infections, there may occur a disturbance of this equilibrium of internal as well as of external origin, causing a recrudescence of the infection. Such an exacerbation of a latent *T. cruzi* infection was involuntarily produced by Wolf *et al.* (1953) administering cortisone to Rhesus monkeys recently imported from India. Although not proved such recrudescences may occur in man.

The final cause of the inflammatory reactions in the acute phase is undoubtedly the parasite.

Arguments against the inflammatory reactions being due to the presence of the parasite are:

(a) Large number of pseudocysts filled with hundreds of parasites are found not to produce any reaction in the surrounding tissues.
(b) Even after the rupture of a pseudocyst there may be numerous leishmania forms of the parasite in its vicinity and within the interstitial spaces, equally without any inflammatory response.
(c) Parasites are almost never seen in the centers of inflammatory foci.

In fact, all arguments presented "against" the parasitic origin of the inflammation are in favor of it. It is not the intact parasite—inside or outside the pseudocyst—that evokes the inflammatory reaction. This reaction is due to the products of parasite disintegration only. "Intact" parasites cannot be found in the inflammatory foci because they have been destroyed.

2. *Degenerative lesions*

In addition to these well known inflammatory reactions, degenerative lesions may be observed after the rupture of a parasitized host cell and following the disintegration of the remaining leishmania forms. These features were rarely observed and therefore their pathogenetic significance was not recognized. Nevertheless, they exactly provide the clue to the interpretation of this disease which Chagas (1911) termed "a new world in Pathology".

In his first report on the pathological findings in Chagas' disease, Vianna (1911) described in the central nervous system "a more or less marked alteration of ganglion cells and their disintegration in the vicinity of ruptured pseudocysts". Fat necrosis around ruptured parasitized host cells in subcutaneous and peritoneal adipose tissue was reported by Mayer and Rocha Lima (1912). Mönckeberg (1924) mentioned "severe lesions of nerve and ganglia" in the heart of dogs experimentally infected with *T. cruzi.*

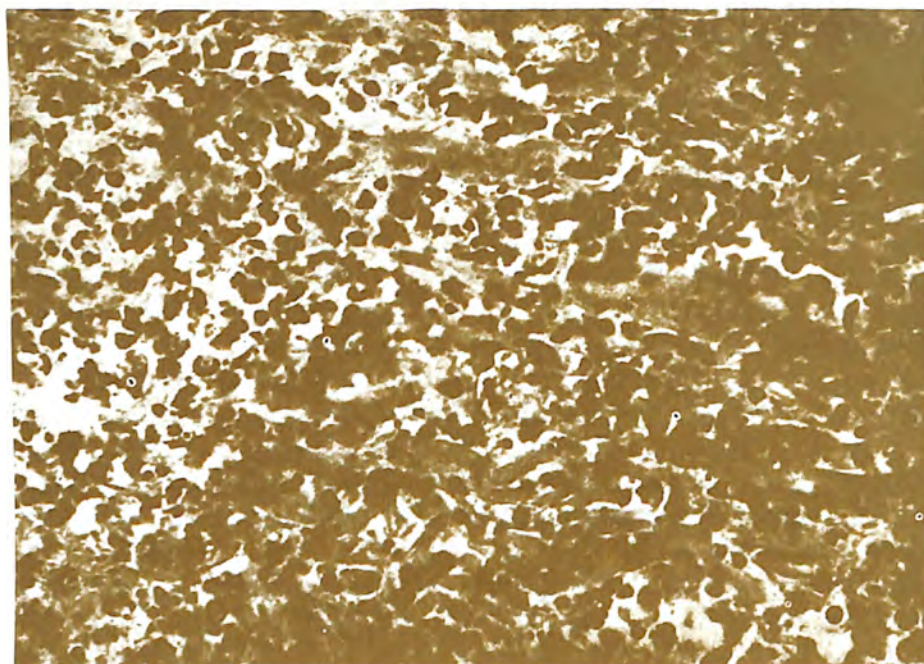
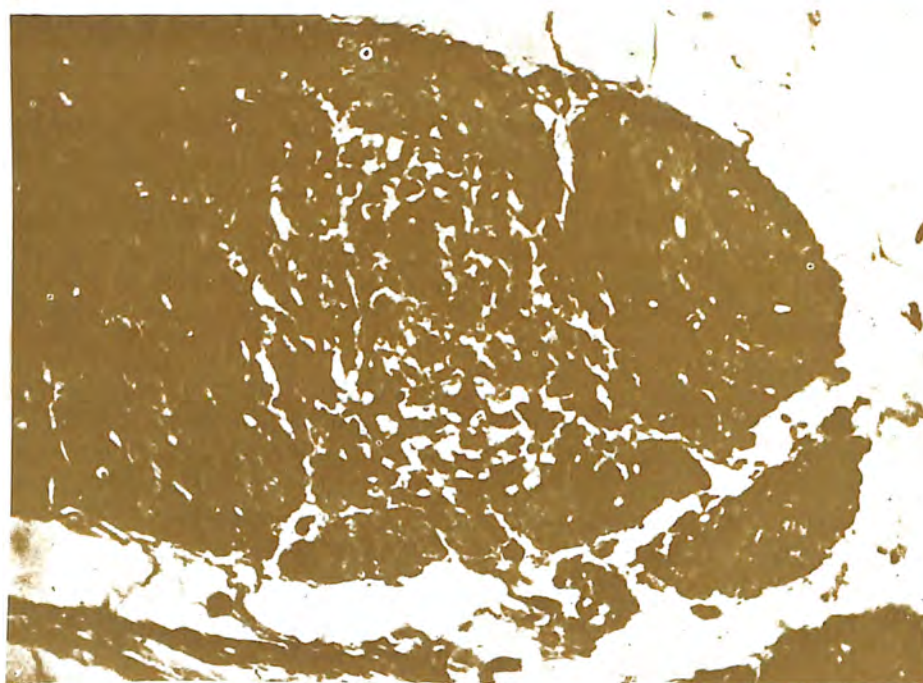
Whereas all these observations were made in the acute phase of experiment-

A

B

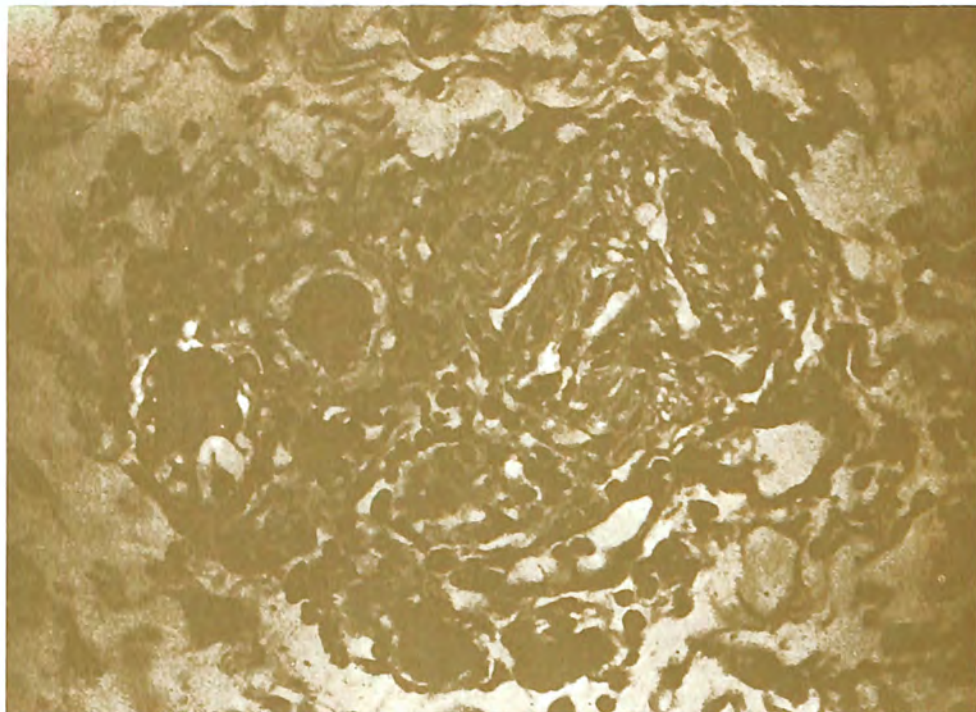
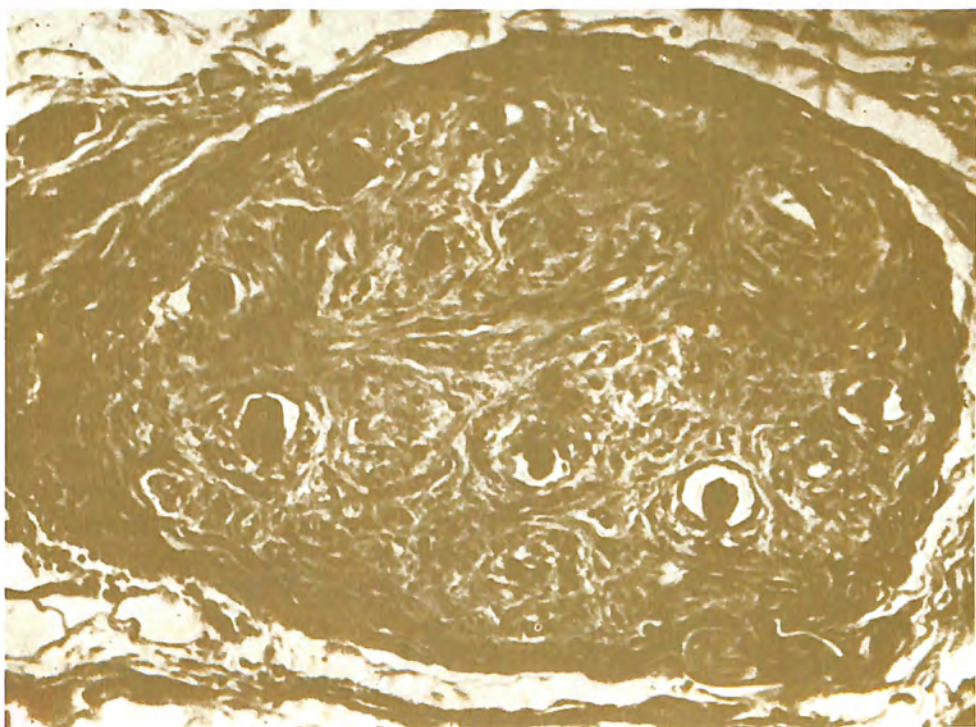
FIG. 3. Inflammatory lesions and degenerative changes in human cases of *T. cruzi* infection. A—Myocardium with acute inflammatory infiltrates containing leishmania forms. B—Chagasic granuloma in the esophagus. C—Severe degenerative lesions of ganglion cells of an autonomic ganglion of the heart in acute Chagas' disease. D—Autonomic ganglion of the heart with marked numerical diminution and degenerative lesions of ganglion cells.

C

D

FIG. 3—*continued*.

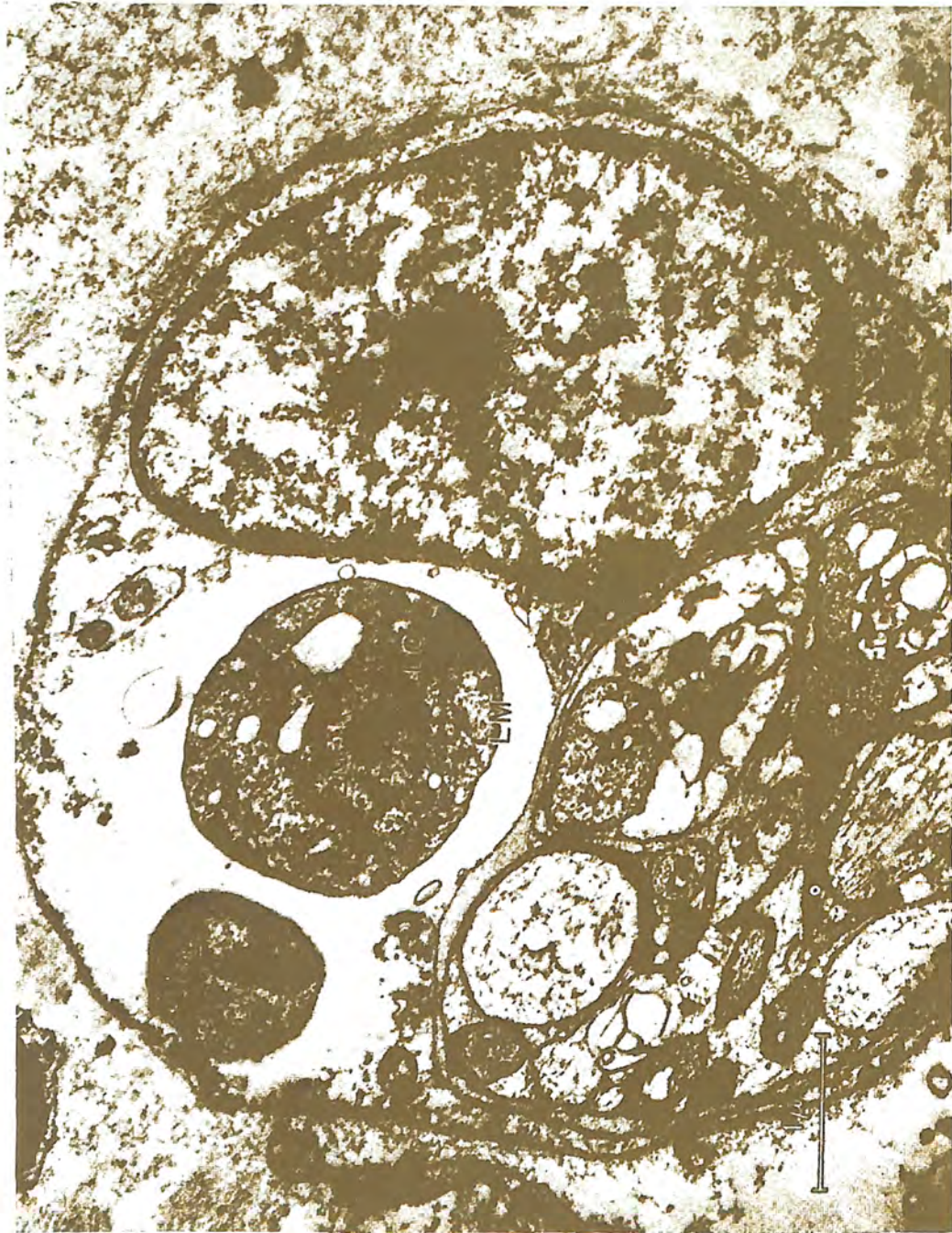



FIG. 4 A. For legend see p. 76.

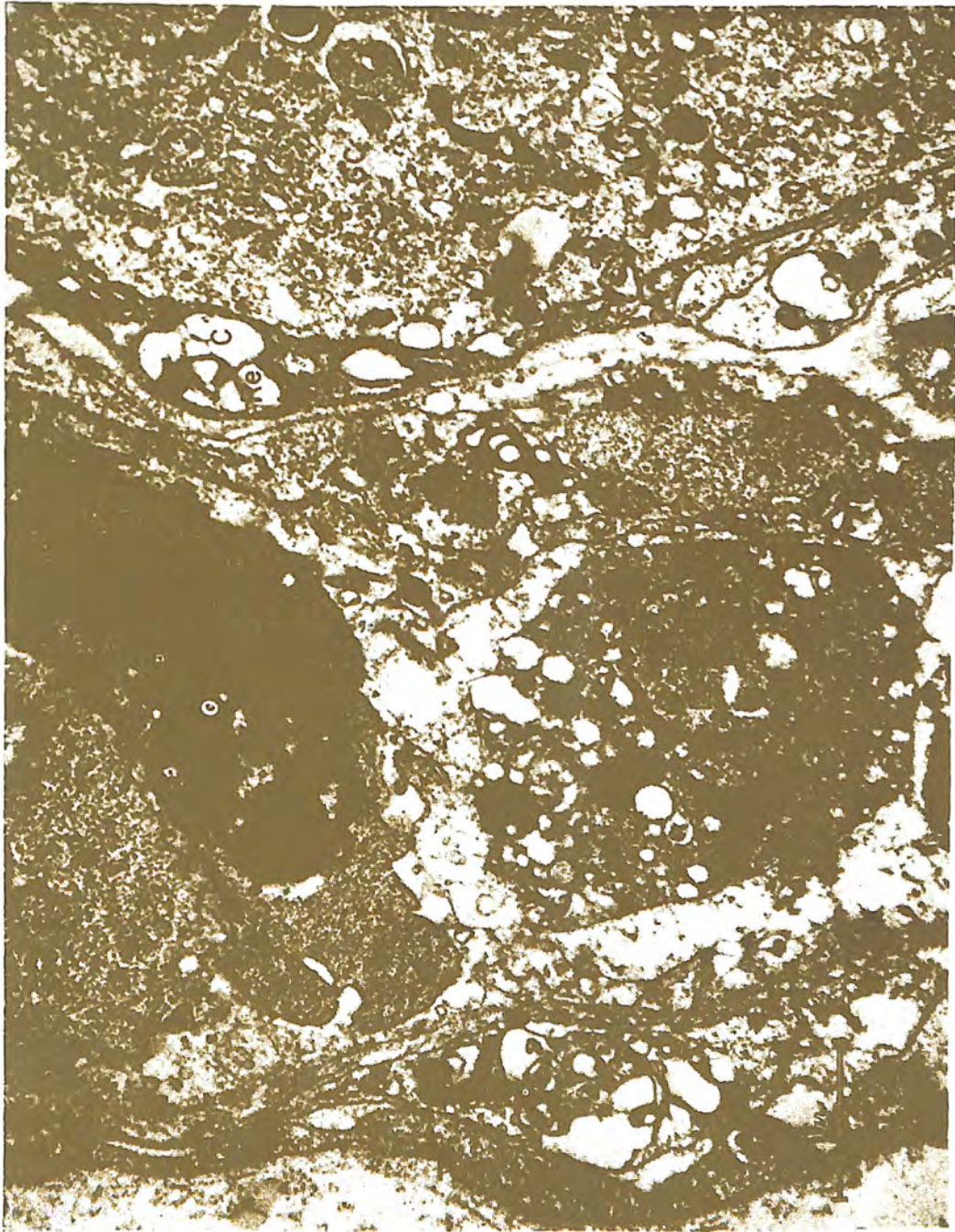



FIG. 4 B. For legend see p. 76.

ally infected animals, through examination of human material from chronic chagasic cases I arrived at the conclusion that in this case there is a marked diminution of the number of ganglion cells in the central and/or peripheral nervous system (Köberle, 1956) (Fig. 3C, D). These findings were experimentally confirmed in animals (Köberle, 1957), suggesting the presence of a neurotoxic substance inside the leishmania forms (Köberle, 1957). This neurotoxic substance is liberated from the leishmania forms after their destruction and acts locally at a short distance only. Tafuri (1967) studied by electronmicroscopy the autonomic ganglia of the heart of mice in the acute phase of the infection, and observed severe lesions of the Schwann cells and ganglion cells. These lesions suggested to him a neurolytic action of the leishmania forms after their disintegration (Fig. 4).

Like the inflammatory reactions, the degenerative lesions are also more frequent and severe in the acute phase of the disease. However, there is a little difference in respect of the time of their appearance. The degenerative alterations of the ganglion cells appear a little sooner than the inflammatory reaction. Once the inflammatory reaction has begun, it is difficult to verify changes in the nerve cells because they are hidden and covered by the infiltration of inflammatory cells. Therefore, the best opportunity to examine the degenerative alterations of the ganglion cells is immediately after the rupture of the pseudocysts, when the inflammatory reaction is still undeveloped. We must admit that the parasitism of the host cell and the inflammatory reactions after the rupture of the pseudocysts are much more impressive than the degenerative changes of the ganglion cells. Sometimes it is difficult to disclose the damage to ganglion cells, which are destroyed and disappear rapidly without any reaction of their satellite cells.

Since the parasites show a preference for the muscle cells, we find the most intensive destruction of ganglion cells where there is intimate connection between muscle tissue and autonomic ganglion cells. This is true of the heart and all the hollow muscular organs. In spite of the sometimes intensive parasitism of the skeletal muscle and the presence of a resulting accentuated and diffuse acute myositis, it is astonishing that the acute Chagas' disease does not produce severe sequelae of the skeletal musculature. This is perfectly explained, however, by the fact that in the striated muscle there are no nerve cells which could be damaged or destroyed.

These degenerative changes of the nervous system occur mainly or exclusively during the acute phase of the disease, when the parasitism is extremely high and a protective barrier is not yet formed by the organism, delimitating the process and avoiding its propagation. Alcântara (1959) has shown that

---

FIG. 4. Electronmicrographs of a parasitized autonomic ganglion of the heart of mice with acute *T. cruzi* infection. A—Parasitized Schwann cell (*SC*) with its nucleus (*SCN*); two leishmanias (*L*) with nuclei (*LN*), cytoplasm (*LC*), cytoplasmic membrane (*LM*) and blepharoplast (*BL*); vacuolization of the cytoplasm around the parasites. B—Leishmania (*L*) in disintegration into the cytoplasm of a Schwann cell (*SC*), with enlargement of the endoplasmic reticulum cysterns (*ReC*); severe alterations of the ganglion cells (*GC*) with tumefaction of mitochondria (*M*) and pronounced lysis of ergastoplasm (*E*). (By courtesy of Dr. W. Tafuri.)

80% of the ganglion cells of the heart may be destroyed during the acute phase in experimentally infected rats.

Investigations carried out in serial histological sections demonstrate that the neurotoxic substance is active only at a short distance and in high concentration, since only the ganglion cells in the immediate vicinity of a ruptured pseudocyst display severe alterations, and even lysis of cells occurs in the presence of many leishmania forms in disintegration. Nerve cells at a short distance from the burst pseudocyst remain completely unchanged. We suppose that the neurotoxic substance which can damage all types of cells—especially nerve cells—is probably an endotoxin or an enzyme.

3. *Allergic reactions*

Allergic reactions in the different organs are found in chronic Chagas' disease as in most other chronic infectious diseases. Muniz and Azevedo (1947) demonstrated allergic manifestations in the heart after inoculation of dead trypanosomes. Necrotizing arteritis was reported in human and experimental material (Köberle, 1957; Brito and Vasconcelos, 1959; Okumura *et al.*, 1960, 1962). The significance of these allergic reactions in the development of the disease is not yet understood.

IV. Concepts of American Trypanosomiasis

Throughout the historical development of ideas about Chagas' disease, there have been disputed problems about its very existence, its importance in Public Health and its manifold aspects. Many physicians working in endemic areas were inclined to attribute several disturbances of the digestive tract—e.g. megaesophagus and megacolon—to American trypanosomiasis. These attempts, however, were strongly rejected by nearly all other investigators, who argued that these "diseases" exist in countries where Chagas' disease was never reported. Meaningless discussions thus continued without palpable results through three decades, because it was impossible to find a common denominator for such different views. As Prado (1959) stressed, "a missing link" in the chain of our knowledge about Chagas' disease has to be searched for, in order to explain the discrepancies between the various attempts at interpretation.

A. Older Concept

For almost half a century Chagas' disease was considered to be a morbid entity beginning with an acute septicemic phase, sometimes fatal, but usually passing after some weeks into a prolonged chronic phase. Since the acute manifestations of the disease disappeared, apparently without sequelae, and further manifestations emerged many years later, these were attributed to the repeated inflammatory foci, caused by intermittent parasitic metastatization. Thus the only form admitted after the period of "rediscovery"—the cardiac form—was interpreted as a "chronic myocarditis" (Fig. 5A).

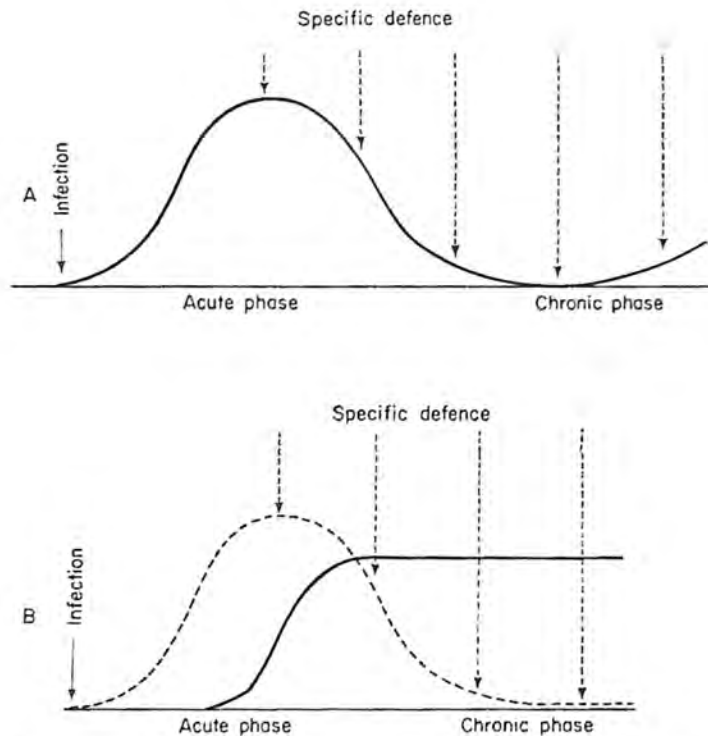



FIG. 5. A—Old concept of *T. cruzi* infection: the curve indicates the parasitism and parasitemia in the acute and chronic Chagas' disease, showing the decrease of the inflammatory reactions with the increase of the specific defense. B—New concept of *T. cruzi* infection: interrupted line represents the parasitism and parasitemia; the full line indicates the destruction of ganglion cells.

B. NEWER CONCEPT

The analysis of our study of the general pathology of *T. cruzi* infection suggests that American trypanosomiasis embodies two different pathological processes.

The initial process is the parasitic infection with its typically local inflammatory reaction, which subsides apparently without any important sequelae in the various organs. Torres (1941) reported that no other disease causes such intense myocarditis as acute Chagas' disease and heals without vestiges. However, this is only an erroneous impression based on a superficial examination, because marked sequelae—the beginning of a new process—are found, after the acute myocarditis, in the autonomic nervous system of the heart, being easily overlooked. As the sequelae comprise a numerical diminution of the ganglion cells, the pathologist has to search for something that has disappeared. Similar lesions occur in the most varied territories of the central and peripheral nervous system. Therefore, we may—*cum grano salis*—compare the acute Chagas' disease with poliomyelitis. In this disease there is also an acute inflammation with degenerative lesions and destruction of the ganglion cells, responsible for the post-poliomyelitic paralytic phenomena. The difference between

poliomyelitis and Chagas' disease consists only in the fact that the virus infection heals whereas the parasitic infection continues in latent form.

Hence we ought to distinguish in American trypanosomiasis according to the classic concepts of the Greek Medicine of "Nosos" and "Pathos", i.e. between Chagas' disease and Chagas' syndromes (Fig. 5B):

(a) *Chagas' disease*, in the strict sense, that is, infection by *T. cruzi* showing an acute septicemic phase, which passes after the development of the specific defense of the host into a chronic phase, with rare parasites in the circulating blood and in the body tissues;

(b) *Chagas' syndromes*, sequelae of Chagas' disease, also called "late manifestations" of the disease, which develop as the result of the extensive destruction of ganglion cells in the peripheral and/or in the central nervous system during the acute phase.

According to our new concept on *T. cruzi* infection, all the so-called "late manifestations", which were until now considered to be the expression of the chronic Chagas' disease, represent in reality Chagas' syndromes and, as they are caused by a numerical reduction of the ganglion cells, are essentially *neuropathies*. The symptomatology of these neuropathies has to be evaluated mainly through functional methods. The extension and intensity of such functional derangements depend not exclusively, but principally, on the degree of the numerical reduction of ganglion cells. This more or less marked denervation must be confirmed by quantitative and comparative studies on material obtained from normal and chagasic cases. Such investigations are easy, but very tiresome, requiring thorough examination of great numbers of histological sections.

1. *Quantitative study of the nervous system in man*

In the study of the nervous system in man the following methods were employed.

(a) *Ganglion cell counting in the digestive tract.* Rings 3–4 mm thick were taken at different levels of the digestive tract and embedded in paraffin as a whole or divided in segments 2 cm long. Serial histological sections—each 7 μ thick—were cut and every seventh section mounted and stained with H.E. As the ganglion cells never have a diameter larger than 50 μ, with this technique the double counting of cells is avoided. Twenty sections were taken from each block, completing a total width of approximately 1 mm. The ganglion cells of the myenteric and/or submucous plexuses were counted in the twenty selected sections of every block. In that way the total number of ganglion cells in each of the plexuses—(in a ring 1 mm thick)—of the hollow muscular organ was obtained.

(b) *Ganglion cell counting in the respiratory tract.* Since the distribution of the ganglion cells in the respiratory tract is highly irregular, it was necessary to count the ganglion cells in a ring 1 cm thick, using the same methods as above.

(c) *Ganglion cell counting in the heart.* In the heart the number of ganglion cells was counted in the posterior wall of the right atrium, in a strip taken between the superior and inferior venae cavae.

(d) *Ganglion cell counting in the autonomic ganglia.* The ganglion was entirely cut in sections 7 μ thick and the counting was performed in every seventh section.

(e) *Ganglion cell counting in the central nervous system.* In the central nervous system the counting of ganglion cells was accomplished with the same technique in pre-established areas.

2. *Quantitative study of the nervous system in animals.*

(a) *In mice and rats.* Due to the smaller diameter of the ganglion cells in these animals (average of about 24 μ), histological sections 8 μ thick were obtained and each third section was selected for counting.

(b) *In cats and dogs.* In these animals the same method used for human material was applied.

V. The Phases of Chagas' Disease

A. Acute Phase

1. *Symptomatology*

After an incubation period of 1–2 weeks, the disease begins with tiredness, headache, abatement and fever of variable intensity, reaching 38–40°C. Temperatures above 40°C (104°F) are usually rare. The fever may be continuous or recurrent, lasting 4–5 weeks and then falling gradually to normal. An edema of elastic consistency may appear during the second week. It may be localized (chiefly in the face) or generalized, sometimes suggesting an acute nephritis, and subsides spontaneously with the other symptoms. Generalized lymphadenopathy and moderate hepatosplenomegaly are frequent, and gastrointestinal symptoms (vomiting and diarrhea), cutaneous rash and meningoencephalitis may be present. Nevertheless, the most frequent signs appear in the cardiovascular system: tachycardia (without correspondence to the intensity of the fever), cardiac enlargement, hypotension and heart failure. The electrocardiogram shows sinus tachycardia, low voltage, prolonged P–R interval and primary T-wave changes. This occurs in about half of the cases. The other half shows no EKG alterations (Laranja *et al.*, 1956). Hematological examination reveals leukocytosis due to marked lymphocytosis with relative neutropenia. In the late stage of the acute phase the number of eosinophils may be high.

The severity of the acute disease is extremely variable. Formerly—in Chagas' epoch—the mortality rate was about 50%, whereas today it is less than 5%. Death is caused either by encephalomyelitis or myocarditis.

All these acute manifestations described by Chagas (1916) were confirmed by numerous other investigators. Nevertheless we must emphasize the following symptoms, which Chagas reported but could not explain satisfactorily.

(a) *Tachycardia.* Tachycardia is always higher than one would expect it to be in relation to the fever. Sometimes the frequency is extremely high and continues increased after the remission of the temperature during the recovery. This finding was confirmed by all researchers and yet Laranja *et al.* (1956)

stressed that "the tachycardia very often only manifest or become more intense, when the fever and the other acute phenomena have disappeared".

(b) *Coughing*. Bronchial irritation associated with abundant mucus secretion is also related.

(c) *Dysphagia*. We quote Chagas:

> Another symptom which we observed during the acute infection of adults, is an accentuated dysphagia for solid food and sometimes for liquids too. The swallowing of solid food requires the help of a gulp of water. The patients say that the food stops in the esophagus and produces extreme pain. Even the swallowing of liquids and water may be difficult, sometimes impossible. In this case only a trick can help, namely the ingestion of small amounts of fluid. This phenomenon, without satisfactory pathogenetic explanation, may have some relation to the dysphagia known as "Mal de Engasgo", another endemic disease widely encountered in the interior of Brazil, and according to our observations, specially in those regions where Trypanosomiasis is frequent. Could the "Mal de Engasgo" be another component of the Brazilian Trypanosomiasis, and could that dysphagia of the acute forms represent the initial phase of the syndrome? (Chagas, 1916).

(d) *Diarrhea*. This condition is frequent, very obstinate and cannot be explained either by bacterial or by parasitic intestinal infections.

I emphasize the above four symptoms because they demonstrate impressively the rarity of Chagas' observations.

2. *Pathology*

The pathological findings in fatal cases of acute Chagas' disease were described in detail by Chagas (1911), Crowell (1923) and other authors so completely that nothing need be added.

(a) *Macroscopic findings*. The main macroscopic findings are generalized edema, especially in the face, generalized swelling of the lymph nodes, serous effusions in the body cavities, hyperemia and edema of the brain, spinal cord and their meninges, eventually punctiform hemorrhages in the brain, dilatation of the heart with flabby, friable and spotted myocardium, serofibrinous pericarditis, acute swelling of the liver and acute infectious swelling of the spleen.

(b) *Microscopic findings*. In all organs or tissues are found variable quantities of parasitic pseudocysts and acute inflammatory foci, containing numerous eosinophils. In most cases the heart is the most frequently and intensively damaged organ. It may show a diffuse multifocal myocarditis, sometimes of a phlegmonous type and of an intensity not yet seen in any other known infectious heart disease (Torres, 1941). In the central nervous system forms of the disease the inflammatory infiltrations are more prominent in the brain, spinal cord and leptomeninges. The liver shows a parenchymatous or fatty degeneration and there is an acute splenitis. Parasites are seldom found in the liver or the spleen.

These pathological features in the acute stage of Chagas' disease correspond to a typical form of a septicemic and metastasizing process; all possible variations of intensity and localization can be found.

B. CHRONIC PHASE

1. *Symptomatology*

As the acute phase of Chagas' disease subsides, the chronic phase arises and parasites become extremely scarce in the blood and tissues due to the mobilization of the specific defense of the host. The patient appears to be normal for a long period, 10–20 years (Laranja *et al.*, 1956). However, the diagnosis may still be established by the finding of parasites in the circulating blood (by means of xenodiagnosis) or the highly specific complement fixation test of Guerreiro-Machado.

As already mentioned, acute recurrences of the disease have been provoked in animals but, so far as we know, are not confirmed in man. Such confirmation is needed because if acute stages do not recur, the chronic chagasic infection would be the best protection against a new infection, and to cure it would be unnecessary and might even be harmful.

2. *Pathology*

As in most chagasic cases the acute phase passes into an apparently asymptomatic chronic phase; we find in such instances—if the patient dies in consequence of another fatal illness or an accident—no characteristic features at autopsy. However, painstaking examination of many histological sections will reveal some chronic inflammatory foci or granulomas and, exceptionally, a pseudocyst may be detected. An eventual diminution of the number of ganglion cells in the central and/or peripheral nervous system can be displayed only by quantitative studies of serial histological sections. These lesions of the nervous system, as we have already explained, are determined in the acute phase of the disease, and are not attributable to the chronic phase.

VI. Chagas' Syndromes

Under the term "Chagas' syndromes" we understand all pathological phenomena caused by the diminution in a number of ganglion cells, which may become manifest immediately following the acute disease or after an apparently asymptomatic period of many years. We must emphasize that the denervation is the *absolutely indispensable* element for the appearance of these syndromes, but its development depends on the conjoint action of many other factors, among which the most important are (a) localization and intensity of denervation, (b) sensitivity of the affected organ to denervation and (c) solicitation and overloading of the damaged structure.

For the analysis of any syndrome and its evolution, we have to evaluate the participation of each of the mentioned factors and, when possible, a quantitative study should be carried out.

Concerning the *localization*, it is evident that the manifestation depends on the damage of the corresponding part of the nervous system, be it situated in the organ itself, in its vicinity, or in the central nervous system.

The *intensity* of the *denervation* alone has real value only when related to the sensitivity of the affected organ. In fact, I have established different limits of

tolerance to denervation in various hollow muscular organs (Fig. 6) and verified that a certain denervation may produce severe functional disturbances in one organ, while the same denervation may not provoke functional repercussions in another organ.

In the same way we can understand that the functional disturbance becomes more evident, and occurs sooner, the more frequently and intensively the organ is solicitated or overloaded. Some syndromes thus appear immediately after ganglion cell destruction, whereas others become manifest only after many years. Chagas' syndromes may be explained according to Cannon's law of denervation, which is of the utmost fundamental importance in the hierarchy of the organization of life. In a way, they represent an experiment elaborated by Nature, confirming, in a grandiose example, the validity of Cannon's law!

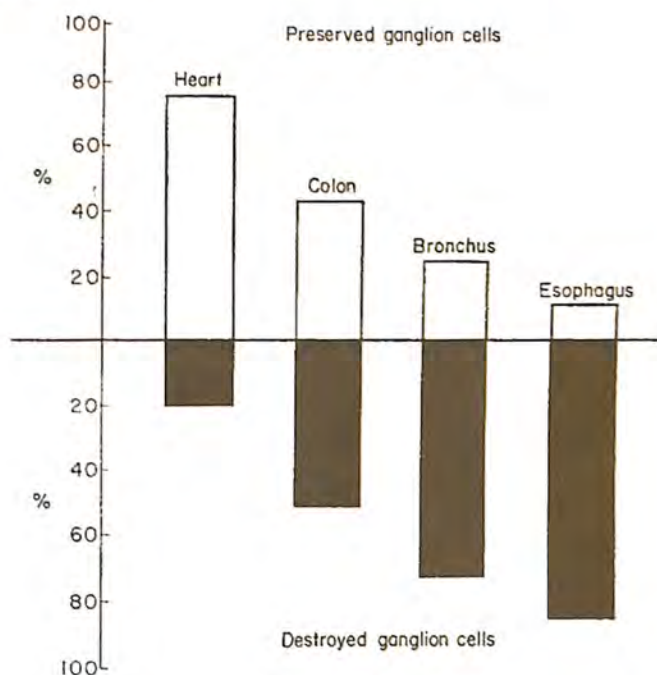



FIG. 6. Limits of tolerance to denervation.

Of all these Chagas' syndromes, the cardiopathy is by far the most frequent and most important. Nevertheless, I will begin my presentation with the disturbances of the motility of the digestive tract, since the pathogenic mechanism is relatively simple and better elucidated than is the very complex pathogenesis of chagasic cardiopathy, which is still problematical.

A. APERISTALSIS AND ENTEROMEGALY

The disturbances of the motility of the hollow muscular organs—so frequently observed in chagasic patients—have been termed "aperistalsis" (Brasil, 1956). For such alterations and their morphological consequences, more than one hundred different terms exist in the medical literature, among

which the most common ones are: achalasia, cardiospasm, idiopathic dilatation, idiopathic hypertrophy; megaesophagus, megacolon, megacystis, etc.; dolichoesophagus, dolichocolon, etc.

About thirty different theories have attempted to explain the pathogenesis of this morbid condition. Such dilatations are relatively rare outside South America and most cases are diagnosed in advanced stages of development. Since the etiology of the lesion in cases outside South America was unknown, it was impossible to trace its evolution and study its pathogenesis. However, once the chagasic etiology of such dilatations of the hollow muscular organs in Brazil (Köberle, 1956) had been established, it became feasible to study the motility of these various hollow organs in all phases of their evolution in a great number of chagasic patients. In fact this was the first step towards elucidating its pathogenesis.

The final stage of the altered motility has its morphological expression in a hypertrophy of the muscle wall, followed by dilatation of the organ. All these dilatations in various organs—e.g. megaesophagus, megacolon, megaureter, etc.—are denoted by the term *enteromegaly*.

Table I shows the incidence of enteromegaly with its distribution in the different organs, and also the various combinations of local manifestations in 800 autopsy cases. Five hundred of these cases showed only chagasic cardiopathy, which was always the cause of death. Three hundred cases disclosed dilatation of one or more hollow muscular organs. The great majority of these enteromegalic manifestations have been found in the digestive tract, and megaesophagus and megacolon were the most frequent alterations (Fig. 7).

1. *Digestive tract*

The denominations megacolon (Mya, 1894) and megaesophagus (von Hacker, 1907) as well as other similar terms are used to denote all such hypertrophies and dilatations of a hollow muscular organ in which neither roentgenological nor gross examination can reveal any obstruction which could explain the dilatation of the organ.

In those cases in which a cause could not be appointed as the origin for the dilatation, many attempts were made to demonstrate an obstacle, because it seemed to be impossible that a hollow viscus could become dilated in the absence of an obstruction. Among these dilatations, the megacolon was best known, after its description by Hirschsprung (1888), who interpreted his impressive findings in newborn infants as a possible malformation of the large intestine. Later on, Mya (1894) introduced the term "megacolum congenitum", defining the lesion as local gigantism, thus avoiding explanation in terms of the presence of an obstacle in the distal portion of the large intestine. His interpretation was accepted and used to explain similar dilatations of other hollow organs; von Hacker (1907) coined the term megaesophagus, suggesting an analogous malformation in the initial part of the digestive tract. Finally, Dalla Valle (1920, 1924) demonstrated that the huge dilatation of the colon is due to an obstruction consisting of a distal aganglionic segment in the rectum. It is noteworthy that Hirschsprung mentioned in his first report that the dilatation did not include the rectum, which seemed to be normal. With the discovery

TABLE I

Chagasic syndromes in the hollow muscular organs of 800 *autopsy cases*

C	500
C—MC	72
C—ME	52
C—MC—ME	50
C—BR	23
MC	22
MC—ME	13
ME	12
C—MC—BR	6
C—MD	4
C—ME—MG	4
C—MC—ME—MD	4
C—MC—ME—MD	4
C—ME—BR	3
BR	2
C—MGb	2
C—ME—MD	2
C—MC—ME—MG	2
C—ME—BR—MD	2
MG	1
C—MG	1
C—MCy	1
C—MU	1
MC—BR	1
MC—MG	1
ME—BR	1
ME—MG	1
ME—MGb	1
MD—MJ	1
C—MC—MGb	1
C—MC—MCy	1
C—MC—MJ	1
MC—ME—MG	1
C—MC—ME—BR	1
C—MC—ME—MJ	1
C—MC—MD—MGb	1
C—ME—MG—MD	1
MC—ME—MD—MJ	1
C—MC—ME—BR—MG	1
C—ME—MG—MD—MU	1
	800

C—cardiopathy; MC—megacolon; ME—megaesophagus; MG—megagastria; MD—megaduodenum; BR—bronchiectasis; MGb—gallbladder; MJ—megajejunum; MCy—megacystis; MU—megaureter.

of Dalla Valle, i.e. the existence of an aganglionic segment, representing the responsible functional obstacle of the intestine, the theory of a congenital malformation was confirmed, but the malformation was represented by the *narrow* distal segment, and not by the dilated part. Thereafter the denomination of megacolon was not justified, because the dilatation denotes only a secondary alteration and not the primary lesion. However, the denomination of megacolon was dangerous as well as erroneous, because it induced surgeons to remove the dilated part (to no purpose), leaving the responsible segment in the body, promoting an obligatory recurrence after an anastomosis was achieved.

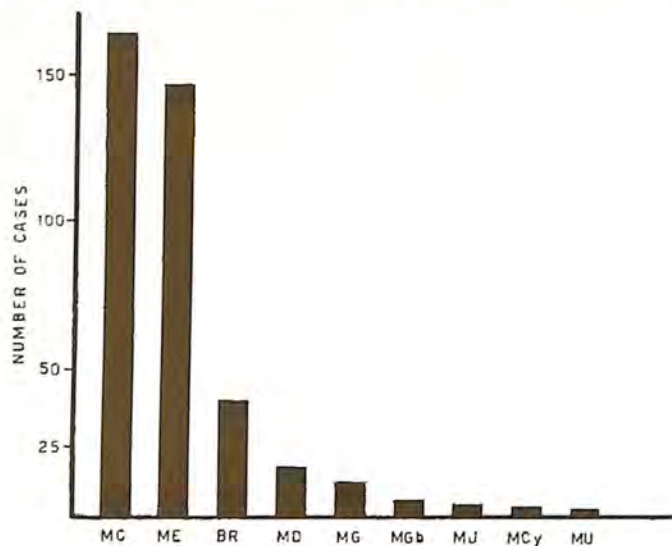



FIG. 7. Frequency of "megas" in 800 autopsied chronic chagasic cases: MC—megacolon, ME—megaesophagus, BR—bronchiectasia, MD—megaduodenum, MG—megagastria, MGb—megagallbladder, MJ—megajejunum, MCy—megacystis, MU—megaureter.

The existence of an aganglionic segment was confirmed by several investigators, and Bodian *et al.* (1949) insisted on the replacement of the misleading term "megacolum congenitum" by the correct denomination of "Hirschsprung's disease". Unfortunately the terms "megacolum congenitum" or "aganglionic megacolum" are still used, giving rise to misinterpretations. Some authors still use the terms "symptomatic" or "organic" megacolum, for dilatations of the intestine caused by organic obstruction (Lee and Bebb, 1951; etc.). These names should not be used, because they are inadequate and call attention only to a secondary phenomenon and not to a responsible original lesion.

The term megacolum, in my opinion, should be reserved for dilatations of the intestine, without a responsible obstacle, in spite of the fact that many authors do not believe in the existence of a so-called "idiopathic dilatation". I quote the following part of Lee and Bebb's article to illustrate the general opinion about this problem:

> The greatest stumbling block to a proper interpretation of the observed facts has been that in so many cases no recognizable organic obstruction could be demon-

strated. That form of megacolon secondary to obstructing stricture or tumor has long been recognized and has been termed symptomatic or organic megacolon. It has never presented any problem, and yet the pattern is so similar to that of the so-called "idiopathic" type that, in retrospect, it seems almost incredible that the latter could have been attributed by so many distinguished observers—including Hirschsprung, Osler and Finney—to a disorder intrinsic within the dilated and hypertrophied bowel itself. If such an interpretation were correct, it would represent the only instance known to medical science of a hollow viscus becoming chronically dilated and *hypertrophied* in the absence of obstruction.

A phenomenon analogous to that referred to with regard to the megacolon occurred with the megaesophagus.

The megaesophagus was considered primarily as a malformation, the dilated part being the pathological one. Hurst and Rake (1930) verified the absence of ganglion cells in the myenteric plexus of the non-dilated segment of the cardia, denominating the functional disturbance achalasia, i.e. non-opening of the cardiac sphincter. It seemed, therefore, that the mechanism of the evolution of the dilatation would be—as in Hirschsprung's disease—an absence of ganglion cells, an aganglionic segment. If this were true, the term megaesophagus should also be abandoned, because the dilatation would represent only a consequence of the achalasia of the cardia.

I believe in the existence of a dilatation and hypertrophy of the hollow muscular organs without obstruction, as a result of an "intrinsic disorder within the dilated and hypertrophied bowel itself". These dilatations could be called "idiopathic" not in the sense that the cause is unknown, but in the sense that the cause resides in the altered part *itself*, represented by severe lesions of the intrinsic nervous system.

This disturbance of the motility is called aperistalsis and the morphological consequences are megaesophagus, megagaster, megaduodenum, etc. The histological substratum of aperistalsis is a more or less marked diminution of the number of ganglion cells of the myenteric plexuses. This diminution has to be verified through quantitative and comparative studies. To show the increasing reduction of nerve cells and its consequences, I shall use the esophagus as a representative model for all types of hollow muscular organs.

(a) *Normal esophagus.* We know today that the peristaltic movement of the esophageal musculature requires only a normal function of the myenteric plexus and of the vagus nerve. The myenteric plexus occupies, in the transversal section, about 5% of the total mass of the esophagus (Köberle, 1963). Ganglion cells rarely appear in this plexus below the level of the cricoid cartilage. They continuously increase in number up to the middle portion and then maintain approximately the same number up to the cardia (Fig. 8). Comparing the three columns we note this uniformity of the distribution of ganglion cells in the inferior half of the esophagus, furthermore a diminution in column B which is still more in column C. It suggests that there may be a decrease in the number of ganglion cells with age. Figure 9 demonstrates very clearly that there is a physiological disappearance of the ganglion cells in the esophagus with increasing age; the numerical diminution of nerve cells occurs uniformly in the entire length of the organ (Köberle, 1963).

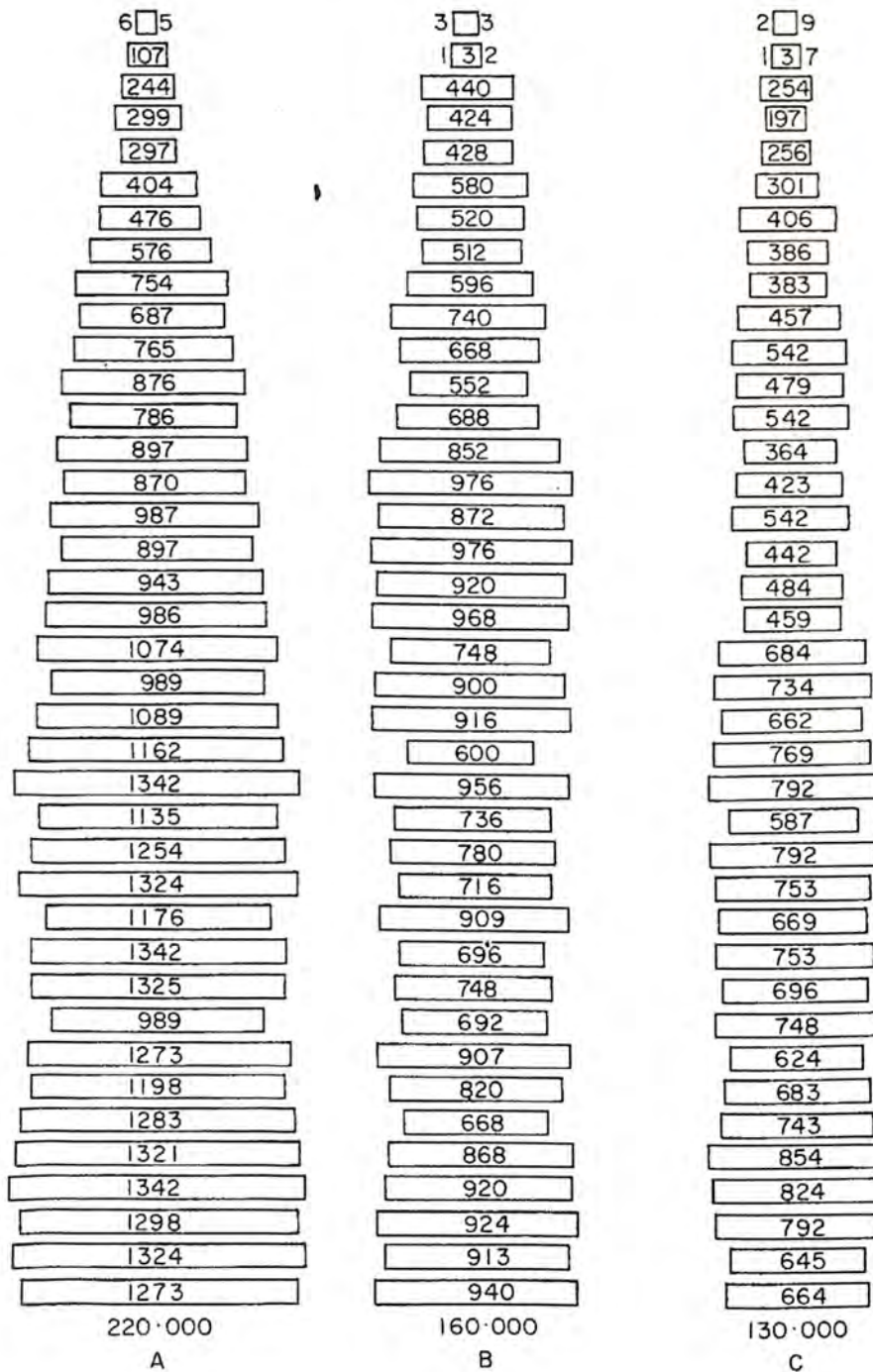



FIG. 8. Innervation of the normal human esophagus. A—20 year-old man. B—60 year-old man. C—75 year-old man.

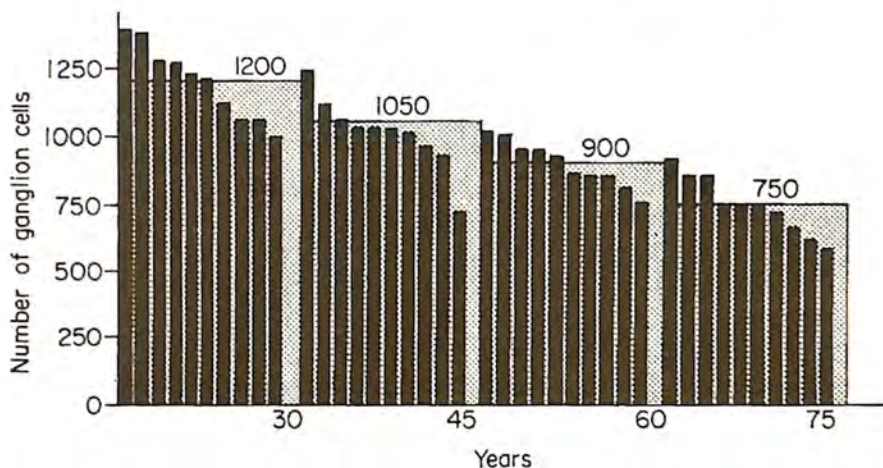



FIG. 9. Physiological diminution of ganglion cells in the esophagus with increase of age.

(b) *Presbyesophagus.* In old age the diminution of nerve cells is more pronounced and can fall beneath 50% of the number found in youth (Fig. 10). It is very probable that such a marked diminution of the intrinsic nervous system may have functional repercussions. The difficulties in swallowing in aged people are generally well known and have been studied systematically by Piaget and Fouillet (1959) in 100 individuals ranging from 63 to 95 years of age. Similar disturbances have been described by Turano (1959), Lauar *et al.* (1959) and Molitor (1962). Soergel *et al.* (1964), studying 15 persons ranging from 90 to 97 years of age, reported tertiary contractions, delay in emptying and moderate dilatation, indicating an insufficiency and disorganization of the motor function of the esophagus; they called this syndrome "presbyesophagus". The physiological numerical reduction in nerve cells is without doubt

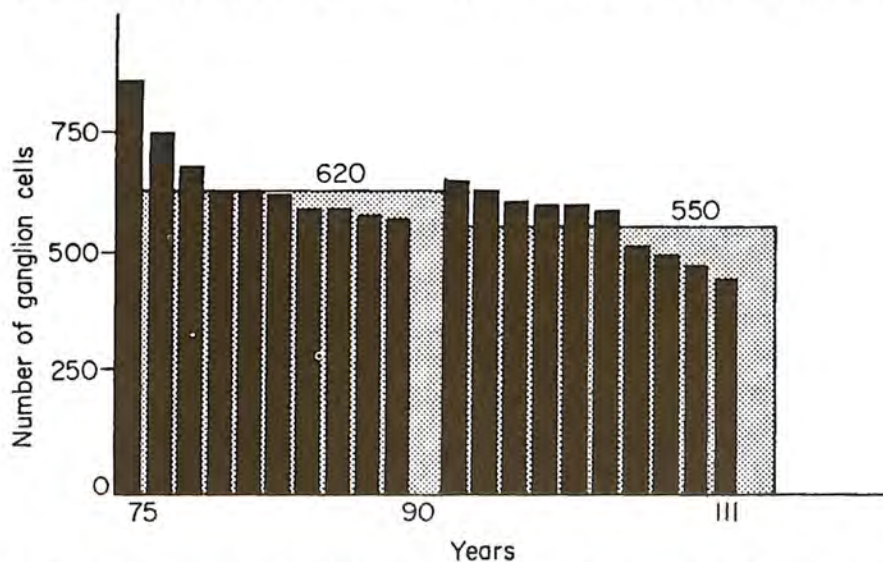



FIG. 10. Presbyesophagus with marked diminution of the number of ganglion cells.

responsible for the altered peristalsis and the difficulties in deglutition found in old people.

(c) *Chagasic esophagus.* As a matter of routine in my Department, the ganglion cells in the lower third of the esophagus are counted according to the method already described. Thus, we have counted the ganglion cells in the esophagus of more than 200 autopsied chagasic cases. From our material will be shown only the representative finding in 40 chagasic esophagus apparently normal at gross examination. Grouping the findings of nerve cell counting according to the patient's age, disclosed a very remarkable phenomenon. We expected to find a more marked diminution of the number of ganglion cells with increasing age of the group, as in normal cases. However, exactly the reverse was found, i.e. an increase in the average number of nerve cells with age (Fig. 11). These singular results are perfectly comprehensible because they

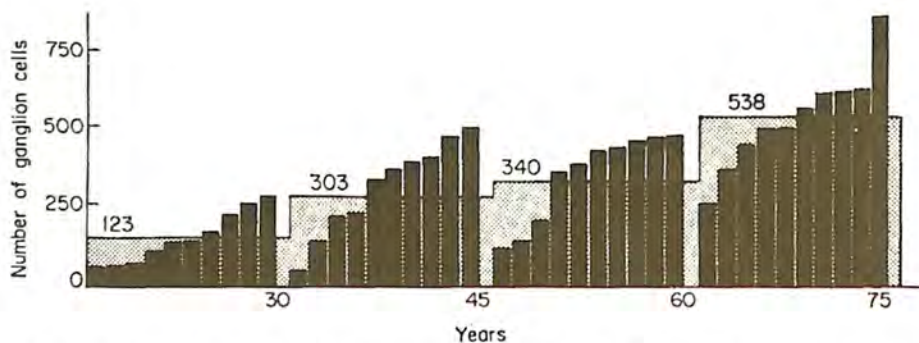



FIG. 11. Chagasic esophagus. Increase of the number of ganglion cells with age.

show only that the chagasic patient will die sooner, the more pronounced his ganglion cell destruction has been. In spite of the fact that all these patients died in consequence of an associated chagasic cardiopathy, the nervous system of the esophagus expressed eloquently the more or less severe damage of the nervous system as a whole.

Most cases are derived from autopsy material. Unfortunately only a few cases occur in which, during life, the motility of the esophagus was graphically recorded; therefore we are not able to correlate the intensity of the denervation with the clinically verified functional disturbance of the organ. We know, through numerous clinical investigations, that the motility of the esophagus is altered in 14–80% of chagasic patients (Rezende and Rassi, 1958; Godoy and Haddad, 1961; Vieira and Godoy, 1963; Morales Rojas *et al.*, 1961; Iñiguez-Montenegro, 1961; Pessôa and Mesquita, 1964; Haddad and Godoy, 1963). These individual results depend in part on the method employed but, evidently, also on the regional differences of the disease.

(d) *Chagasic megaesophagus.* The megaesophagus is so frequent in certain areas of Brazil that the clinical manifestations are well known to the people, and several terms to characterize the disease and symptomatology are in use: "Mal de Engasgo", "Entalo", "Embuchamento", etc.

The most frequent symptoms according to Rezende (1966), expressed as occurring in percentage of patients, are:

Dysphagia 99%, Regurgitation 57%, Odynophagia 52%, Erructation 41%, Singultus 38%, Sensation of plenitude 32%, Coughing 26%.

Pyrosis and loss of weight are also very frequent, occurring in about 70% of the cases (Rezende, 1966).

X-ray examination shows dilatation of the organ mainly in the lower part. Advanced cases also show elongation of the organ, i.e. megadolichoesophagus. The functional study reveals retention of the contrast, which passes gradually at long and irregular intervals through the cardia into the stomach. The Mecholyl test gives positive results, except in cases of extreme dilatation with secondary degenerative changes of the musculature of the organ.

Gross examination shows the characteristic dilatation and hypertrophy of the musculature, which can reach 26 times the normal weight. The mucous membrane is generally thickened, with patchy leukoplakia most marked in the lower part. In cases with severe stagnation, small erosive lesions or a diffuse esophagitis are found in this same localization. Cases with very prolonged evolution show a predisposition to carcinoma, which may occur in 10% of the cases (Camara-Lopes, 1962). All these alterations are limited to the thoracic part of the organ, while the abdominal portion does not disclose any gross changes.

On microscopic examination the various layers of the organ show different alterations. The epithelium of the mucous membrane is thickened and may disclose cornification of its superficial layer. Leukocytic infiltration and erosions of the epithelium are secondary changes occurring in advanced cases. These inflammatory infiltrations may penetrate the muscularis mucosae, sometimes the submucosa, but never the tunica muscularis propria. Hypertrophy of the muscularis mucosae is frequent. However, the most impressive feature is, without any doubt, the hypertrophy of the tunica muscularis propria. The increase in thickness of this muscular mass is always much more evident in the inner layer than in the outer layer. While normally the ratio between the former to the latter is 0·9:1·0, it may reach 1·0:6·0. The reason for this difference lies in the fact that the inner circular layer is much more distended than the outer longitudinal layer, due to the dilatation of the organ. Quantitative studies of the number of muscle cells in normal esophagus and megaesophagus demonstrated that the increase of musculature is the consequence of a hyperplasia (Pereira and Gonçalves, 1958). In this muscle layer small localized lympho-histiocytic infiltrations are sometimes seen, especially near the myenteric plexuses. Typical granulomas with giant cells are very rare. Proliferations of the preganglionic nerve fibers, giving rise to features very similar to those found in traumatic neuromas, may occur. However, the most striking and important finding is a *negative* one, i.e. the absence of more than 95% of the ganglion cells of the myenteric plexuses (Fig. 12). The decrease in number of nerve cells is found uniformly along the whole extension of the esophagus, including the abdominal part also, which appears completely normal at gross examination (Fig. 13).

FIG. 12. Chagasic megaesophagus with loss of more than 95% of ganglion cells.

The consequences of the destruction of the ganglion cells of the myenteric plexus of the esophagus are as follows: (1) loss of the coordinated peristalsis, (2) supersensitivity of the denervated musculature. This phenomenon, occurring in a denervated hollow muscular organ, was called by Brasil (1956) "aperistalsis".

FIG. 13. Abdominal portion of ten cases of megaesophagus, showing the same denervation as the thoracic portion of the esophagus.

The absence of ganglion cells of the plexus does not, therefore, mean absence of the peristalsis only. In conformity with Cannon's law, the denervated structures become supersensitive to any stimuli, especially to the adequate substance which in the present case is acetylcholine. Therefore, the Mecholyl test is positive in chagasic esophagus and in chagasic megaesophagus (Vieira and Godoy, 1963; Vieira, 1964; Pessôa and Mesquita, 1964), sometimes in an

impressive manner, inducing diffuse and severe spasms of the organ, which occasionally need an urgent application of atropin. It is understandable that the transport of the contents in a hollow organ becomes slower, irregular and sometimes arrested, when the peristaltic movement is severely disturbed and partially substituted by uncoordinated non-propulsive contractions. Obviously there is a retention or temporary stagnation of the contents, with prolongation of the emptying time. All these phenomena are responsible for the dilatation of the organ, which implies a distension of the muscle fibers. This stretching leads to hypertrophy of the muscle, causing more powerful contractions and making still more difficult the passage of the contents. Through this vicious circle of change, monstrous degrees of muscle hypertrophy and dilatations of the organ finally occur. In this way the uncoordinated peristalsis associated with supersensitivity of the denervated structure *per se* induce a dilatation of that aperistaltic hollow organ, through retardation and stagnation of the contents. Therefore, I do not find it "incredible that a hollow viscus becomes chronically dilated and hypertrophied in the absence of obstruction" (Lee and Bebb, 1951). In chronic chagasic patients we can find dilatations and hypertrophies of hollow organs without a sphincter (megaduodenum, megajejunum, megaileum, megatrachea, etc.), which prove that a sphincter is not indispensable for the occurrence of a "mega" formation.

Most authors have attributed the megaesophagus to the presence of a "hindrance" at the level of its terminal portion: "spasm of the lower esophagus" (Zweigel, 1733), "cardiospasmus" (von Mikulicz, 1904), "hiatospasmus" (Lotheissen, 1926; Jackson, 1922), "phrenospasm" (Jackson, 1922), "fibrosis of the terminal esophagus" (Mosher, 1933), "compression by the aorta" (Handford, 1888), "compression by the diaphragm" (Sauerbruch and von Hacker, 1906), "compression by the liver" (Mosher, 1922), "compression by the lung" (Mosher and McGregor, 1928), "achalasia of the cardia" (Hurst and Rake, 1930), etc.

Of all these, the only mechanism that really exists is the achalasia, i.e. the non-relaxation of the lower esophageal sphincter. Since in the chagasic esophagus the reduction of the number of ganglion cells is the same in the thoracic portion as in the abdominal portion of the organ, an aperistalsis is also present in its abdominal portion. This aperistalsis of the terminal esophagus in fact represents an achalasia of the lower esophagus sphincter, because it does not relax at the exact moment when the thoracic portion of the esophagus contracts. As already stated, there is an aperistalsis of the entire esophagus, including its abdominal portion and the lower esophageal sphincter. The most important lesion is the denervation of the thoracic esophagus and this can be illustrated by two facts: first, many patients with aperistalsis refuse the diagnosis of an obstacle at the end of the esophagus, emphasizing the disfunction of the thoracic portion ("the force is absent", "the food is not driven forward", "the food is not pushed from above", etc.); and secondly, there are cases of megaesophagus in which the cardia functions regularly. These cases always show a slight dilatation of the lumen only. These facts demonstrate on the one hand, that a "hindrance" represented by an achalasic sphincter is not essential for the development of a dilatation in an aperistaltic hollow organ, but show

on the other hand, that a hindrance contributes markedly to the development of monstrous dilatations in cases of advanced megaesophagus.

Other factors also play important roles in the pathogenesis of megaesophagus and other "megas": (1) nature of the contents, (2) time and (3) psychic factors.

Concerning the nature of the contents the consistency of the ingesta is very important, because the transportation of solids needs a better coordinated peristalsis than the movement of liquids through a lumen representing a high overload to the damaged organ. I believe that the increasing consistency (reduced liquidity) of the contents of the esophagus is an aggravating factor in the development of the megaesophagus. This is well illustrated by the patients with megaesophagus who frequently drink large quantities of liquids to aid the passage of the solid ingesta through the organ. The temperature of the ingesta is also of some importance. Generally, either very hot or very cold food increase the difficulties in swallowing, and perhaps the associated abundant salivation constitutes a type of auxilliary mechanism for the deficient deglutition. The significance of the temperature of food and the extraordinary frequency of the dysphagia in chagasic patients is indicated by the stereotyped answer to the physician's inquiry, "But, Doctor, who doesn't have difficulty when eating cold rice?"

With regard to time, it is established that the development of the dilatation is generally a slow progression, taking many years to reach the final stage of megadolichoesophagus (Rezende, 1963). However, a very rapid development of the megaesophagus, corresponding to a severe degree of denervation, may be seen, though rarely. Thus Rezende (1963) observed an acute case of Chagas' disease in a three-year-old child, who immediately after the acute disease had severe difficulties in swallowing and in defecation. Eight months later a surgical operation (cardiomyotomy after Heller) was performed and repeated twice without evident results. The child died after the third operation, about eighteen months after contracting the acute disease. The ganglion cell counting at three different levels of the esophagus (upper, middle and lower portions) gave, as a maximum value, three ganglion cells in a ring of 1 mm thickness. This case demonstrates two important facts: (1) the destruction of the nerve cells occurs during the acute phase of the disease, and (2) the nearly complete denervation may immediately produce a severe dysphagia and in only a few months a marked megaesophagus.

The effect of the psychic factors on the motility of the normal esophagus was convincingly proved by Faulkner (1940), and in cases of "cardiospasm" by Wolf and Almy (1949). In chagasic cases with or without megaesophagus, these psychic influences become strikingly evident, and nearly every patient outlines his own history referring to the aggravation of his sufferings by different emotional conditions. There is one very impressive case of a young man who presented temporarily slight dysphagia, and complained: "Whenever my mother-in-law visits us, I can't even swallow coffee!" Anybody who knows the importance of coffee for a Brazilian will appreciate the great significance of this psychic trauma (Rezende, 1963). Many chagasic patients claim that their esophagus functions like a "barometer" of their mood, and nearly all confirm

that the dysphagia is first observed immediately after emotional stress. Even in non-chagasic cases outside of South America the influence of such stresses is so regularly found as the trigger of the first complaints, that the so-called cardiospasm is by many authors considered to be a psychosomatic disease (Carvalho, 1950; Hoff, 1953; etc.).

(e) *Chagasic megacolon.* The same reduction in the number of ganglion cells with increasing age is found in the colon as in the esophagus (Fig. 14). In my opinion, this finding explains the frequent constipation present in old people. Similar disturbances of the motility of the large intestine with no

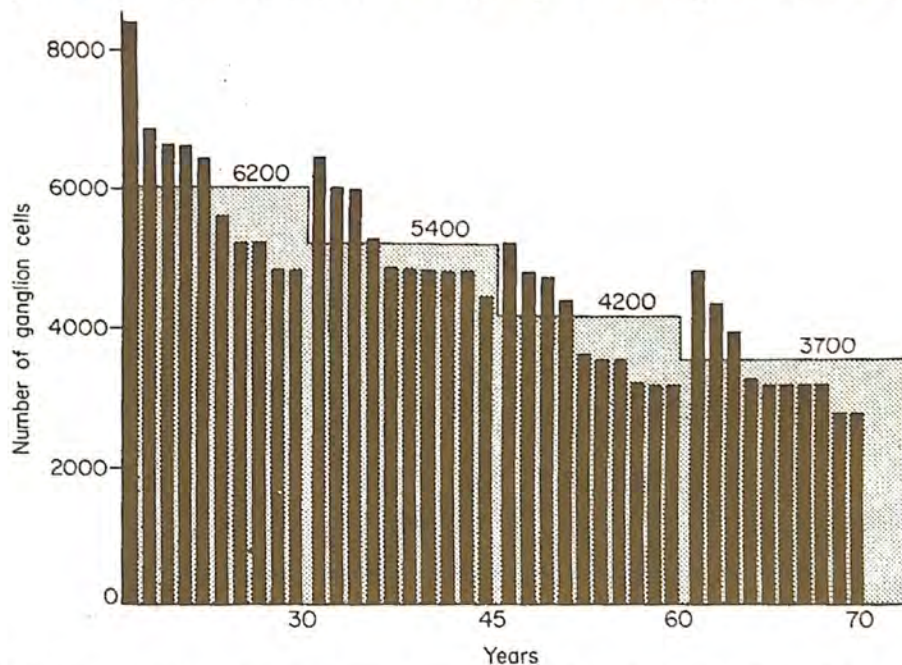



FIG. 14. Physiological diminution of ganglion cells in the colon with increase of age.

dilatations are frequently observed in chronic chagasic patients whose complaints are meteorism, irregularity of peristalsis and difficulties of defecation. These cases without dilatation of the colon, but with a remarkable reduction of the number of nerve cells, can be registered under the term of chronic chagasic colopathy. If the reduction of ganglion cells surpasses a critical limit—55%—dilatation and hypertrophy of the colon are initiated, leading to a megacolon or megadolichocolon (Fig. 15).

The main symptom of megacolon is a difficulty or an impossibility of evacuation. Patients who do not defecate for 2–4 months are not rarities and in some cases retention of feces may even last 5–6 months. It is remarkable that many such patients feel no discomfort, do not complain about indisposition and come to the hospital because of some complication. These complications are (1) volvulus of the dilated sigmoid loop, (2) formation of fecaloma with decubital ulcer, (3) perforations of this ulcer associated with peritonitis, and (4) very rarely, primary perforation without previous ulceration. The macroscopic findings at autopsy or during the operation are impressive because of

the dilatations, which may sometimes reach gigantic dimensions with a capacity of 30–40 liters. The thickness of the intestinal wall attains about 0·5 cm and the length of the dilated colon may surpass 2 meters.

It is evident that a denervated organ becomes dilated only upon functional solicitation. This can be demonstrated frequently in cases of megacolon which need a transversostomy to reduce the enormous dilated sigmoid before the

FIG. 15. Megadolichocolon in a chagasic patient.

definitive sigmoidectomy. When the surgeon, some weeks later, sends the surgical specimen to the pathologist, the previous dilatation has almost subsided and only the thickening of the muscle layer (which may reach 1·0 cm or more) indicates that we are dealing with a megacolon.

Figure 16 shows the different degrees of denervation in 40 chagasic cases with and without megacolons. The denervation is also uniform in the entire length of the intestine and the appendix, a finding completely different from the alterations encountered in Hirschsprung's disease (Köberle, 1957, 1962; Costa

1963a, b; Brandão and Köberle, 1964). The supersensitivity of the denervated large intestine to cholinergic drugs was clinically demonstrated (Vieira *et al.*, 1964b).

(f) *Other "mega" formations.* As was shown in Fig. 6 and Table I, the incidence of "megas" in other segments of the digestive tract is relatively rare in spite of the sometimes marked denervation in this part (Costa and Alcântara, 1965, 1966). The liquid contents in the stomach, small intestine and biliary tract, may militate against marked dilatation.

FIG. 16. Results of ganglion cell counting in normal colons (*N*—normal average), in chagasic colons without macroscopic alterations, and in chagasic megacolons.

2. *Respiratory tract*

In the respiratory tract, in cases of chronic chagasic patients, dilatations of the trachea (megatrachea) and bronchiectasis are also found (Köberle, 1959). It seems remarkable at first sight that even hollow organs, transporting gaseous contents and without any sphincter, may be the seat of dilatations after denervation. However, these findings demonstrate that even in the respiratory tract, where air is apparently passively transported, its movement—inflow and outflow—is controlled by precise nervous coordination of the muscular contraction of the trachea and bronchi walls. The neurogenic bronchiectasis in chagasic patients is well pronounced but never very impressive. Therefore, it is easily overlooked at autopsy. Even in my Department—where we always search for respiratory manifestations of Chagas' disease—the frequency of bronchiectasis is about 5 %, while a previous bronchographic study in chagasic patients in our University Hospital reaches 45–65 % (Souza, 1966).

Investigations into disorders of the motility of the bronchi gave a much higher incidence of "aperistalsis" of the bronchi (Godoy, 1963). The Mecholyl-test demonstrates clearly the supersensitivity of the denervated bronchi (Manço *et al.*, 1967).

In apparently asymptomatic cases the percentage of bronchopathy was 29 %, in cases of megaesophagus 50 %, and in cases of megaesophagus and megacolon 80 %.

The results of ganglion cell counts indicate that chagasic bronchopathy is characterized by a numerical diminution of less than 75 % and that bronchiectasis occurs with a reduction higher than 75 % (Köberle, 1962).

3. *Urinary tract*

In our autopsy material aperistalsis of the urinary tract with megacystis and megaureter is very rare. We have found only three cases of megacystis and two cases of megaureter. Clinically the urinary bladder of the chagasic patients better supports an abrupt instillation of fluid than the normal one, as revealed by cystometry (Ciconelli, 1963).

Ganglion cell counts have not been made in human beings. The diminution in number of ganglion cells of the hypogastric plexus in experimentally infected rats is about 45 % (Ciconelli, 1964).

B. CARDIOPATHY AND CARDIOMEGALY

Chronic chagasic cardiopathy is the most frequent Chagas' syndrome and also the commonest cause of death in chronic chagasic patients. In our autopsy material, of nearly 1000 cases, 87 % of the deaths were due to cardiopathy, with higher incidence in males (about 66 %) (Fig. 17).

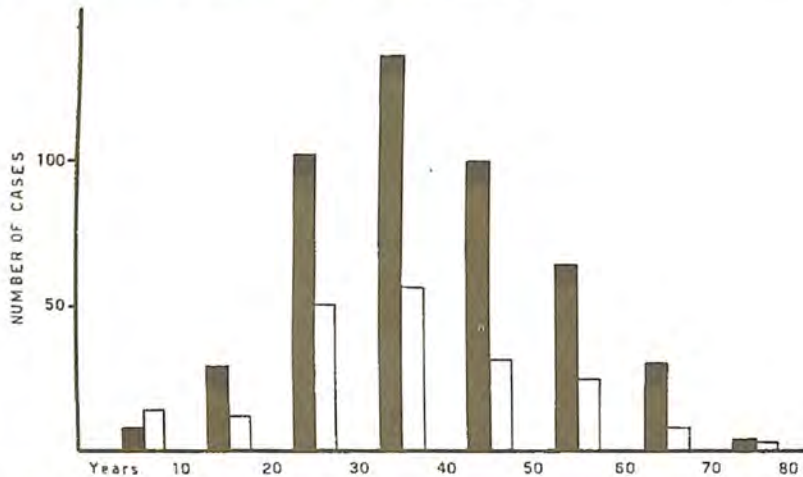



FIG. 17. Frequency of cardiopathy in males (black) and females (white) according to age.

1. *Symptomatology*

The cardiopathy was characterized by Chagas as a heart disease with changes in the formation and conduction of stimuli, constituting "a new chapter in human pathology". In his publications with Villela (1922), the following symptomatology was reported:

(a) Tachycardia and bradycardia.
(b) Disturbance in the pathway of the conduction:
  (i) Retardation of the conduction (prolonged P–R interval)
  (ii) Partial block
  (iii) Total block (dissociation of the rhythm of the atria from the ventricles).
(c) Premature beats
  (i) Atrial extrasystoles
  (ii) Ventricular extrasystoles.

(d) Atrial tachysystolia ("atrial flutter").
(e) Paroxystic tachycardia (atrial, ventricular and nodal).
(f) Complete arhythmia (atrial fibrillation).
(g) Alternans.

The rural people of the endemic areas have long known this peculiar heart disease with its characteristic rhythm alterations, and even name them: "Baticum" (palpitations), "Vexame do Coração" (heart irritation), "Coração de Boi" (ox heart), etc. They are also well aware of the rough symptomatology which consists of attacks of an inexplicable "shooting" of the heart beats, dizziness, blurred vision, loss of consciousness, and episodes of heart standstill. All these symptoms are frequent in young people, and sudden death occurs in a great number of cases. Oddly enough, in certain regions where "Baticum" is common, barkeepers do not sell alcoholic drinks upon trust for fear of losing their money. Because of the frequency of sudden cardiac death in young men, there are villages in endemic areas officially named "Recanto das Viuvas" (Widow Villages). Football teams always have reserves because not infrequently some of the players die suddenly during the match.

The cardiac manifestations appear generally after a long asymptomatic period varying from 10 to 20 years. We know very little about this latent period, because the patients have no complaints and do not seek medical assistance. From a group of 57 patients observed during 10 years after the initial acute infection, 40 showed a normal EKG and 17 developed EKG abnormalities which were transient in 5 and permanent in 12 (Laranja *et al.*, 1956).

In chronic Chagas' heart disease signs and symptoms do not appear always simultaneously. Thus we can find cases with advanced cardiomegaly and severe EKG changes with no subjective complaints. The initial symptoms are palpitations, a certain precordial discomfort—different from angina pectoris—and dizziness. In a later stage, paroxysmal tachycardia, marked bradycardia and episodes of multifocal extrasystoles are common. Sometimes bradycardia may cause temporary cardiac standstill and epileptiform seizures. Right heart failure is more common than left heart failure and not secondary to the latter (Lima and Rassi, 1962).

The systolic blood pressure is normal or lowered; and the pulse pressure is sometimes markedly reduced.

The EKG findings are very characteristic of the chronic chagasic cardiopathy and very probably permit diagnosis. Another characteristic feature is the "mutability" (Brasil, 1953) of the EKG alterations, the great variations occurring mainly in conduction system. In the different Latin American countries where Chagas' disease is endemic, the various types of EKG changes and its incidence are very similar.

Among these EKG changes, ventricular extrasystoles (60·67 %), right bundle branch block (43·20 %) and A-V blocks (17·93 %) are the most frequent (Lima and Rassi, 1962).

Cardiac death may occur from cardiac failure, but the most characteristic death is the sudden and unexpected one. Chagas himself had reported that in Lassance (Minas Gerais, Brazil), where he discovered the disease, almost every family lost one or more of its members by this typical sudden heart death. One

would expect that sudden death would occur during excessive physical effort—such as football, or any other overwork—but it is strange that in most cases this type of death takes place under emotional stress. It is very common for the cardiac patient to come to the hospital in a decompensated state; he is treated and compensated, and when he is just about to leave the clinic he falls down and dies at the hospital door.

2. *Pathology*

The gross pathology of the chronic chagasic cardiopathy is variable from apparently normal findings to enormous cardiomegalies. However, a special preparation is essential to demonstrate the characteristic lesions. In order to obtain a good anatomical specimen we use the following method:

(i) Removal of the heart by sectioning the blood vessels as near as possible to the pericardial sac.
(ii) Careful washing of the heart chambers in the direction of the blood stream, with running water, removing all blood.
(iii) Ligature of all pulmonary and caval veins.
(iv) Injection of 5% formalin solution, at a pressure of about 100 mm of Hg, through the aorta with the canula introduced beyond the aortic ostium into the left ventricle. When the left heart chambers are well distended, the canula is removed. Now the coronary system is injected. Ligature of the aorta follows. The right heart chambers are injected in the same way and the pulmonary artery tied. The distended heart is immersed in a tub containing 5% formalin solution for 24 hours.
(v) The fixed heart is divided by a frontal section, beginning at the apex and proceeding to its base, into anterior and posterior halves. This section accompanies the margo obtusus and the margo acutus, dividing the mitral and tricuspid ostia, and also the corresponding atria, into anterior and posterior parts.

(a) *External inspection of the heart.* Chagasic hearts may appear quite normal in size and form. However, the great majority show marked alteration of size and frequently changes in form too. We may find all degrees of enlargement of the organ, predominantly of the right heart and strikingly of the right atrium. Monstrous cardiomegalies can be found. The heart can become almost spherical with separation between the right and left apex (cor bifidum), and bulging of the conus arteriosus and circumscribed swellings of the apical region, more frequently on the left than on the right side. Sometimes there are either large white plaques in the pericardium or tiny white granules along the coronary vessels (fibrous pericarditis in rosary). Thinning of the muscle wall of the ventricles and principally of the right atrium is very characteristic. Transillumination shows the translucent areas very distinctly (Fig. 18).

(b) *Internal inspection of the heart* (Fig. 19). In the great majority of cases the chagasic heart shows dilatation of all chambers, predominantly on the right side, and—almost always excessively pronounced—of the right atrium, which appears translucent. The thickness of the wall of the ventricles is variable,

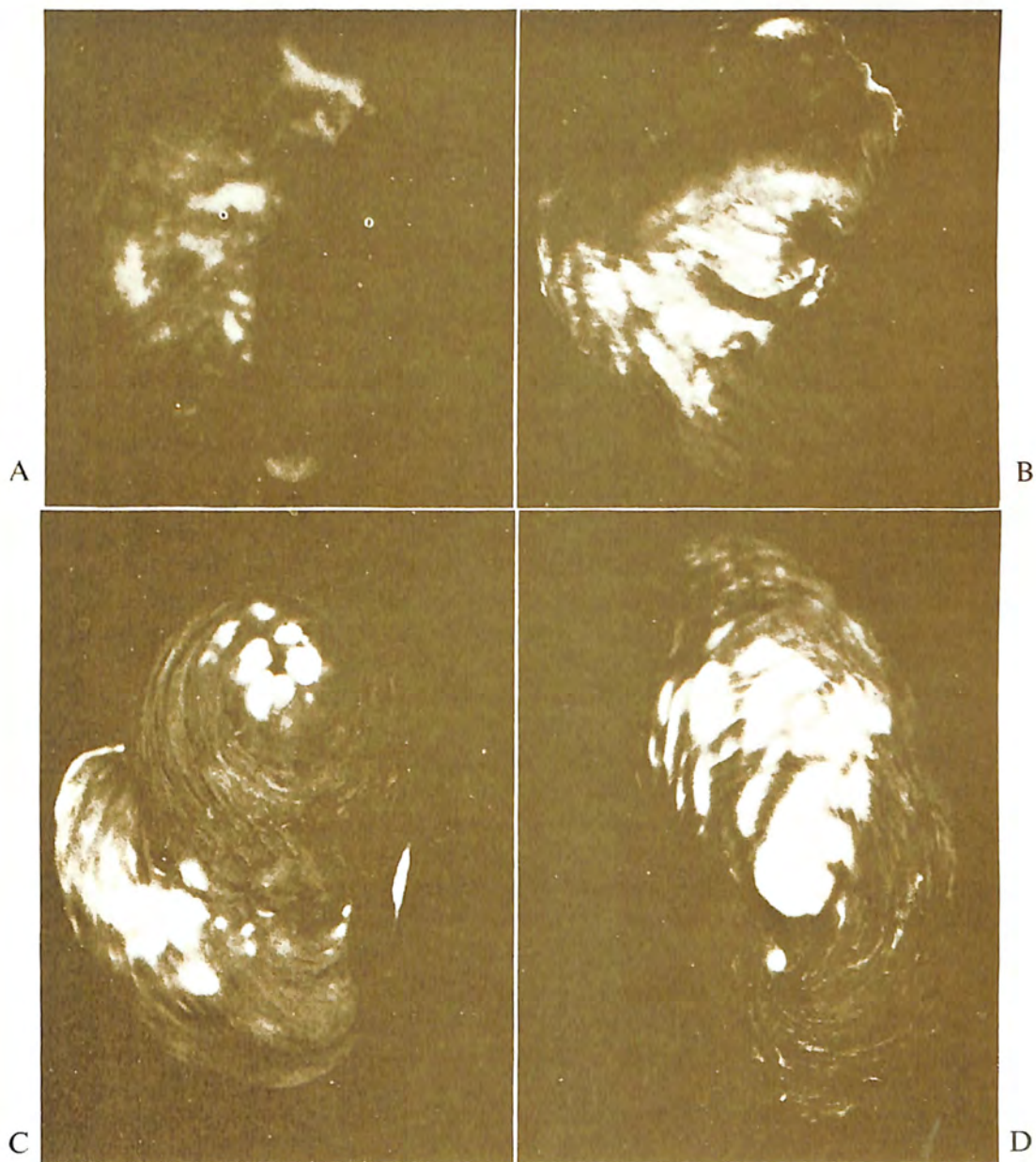



FIG. 18. Transillumination of chagasic hearts, showing the thinning of the muscle wall. A—cor bifidum with aneurysm at the left apex and thinning of the conus arteriosis. B—thinning of the inferior part of the anterior wall, right ventricle. C—aneurysm at the left apex, thinning of the wall of the conus arteriosus. D—small aneurysm at the left vortex and large aneurysm of the right ventricle.

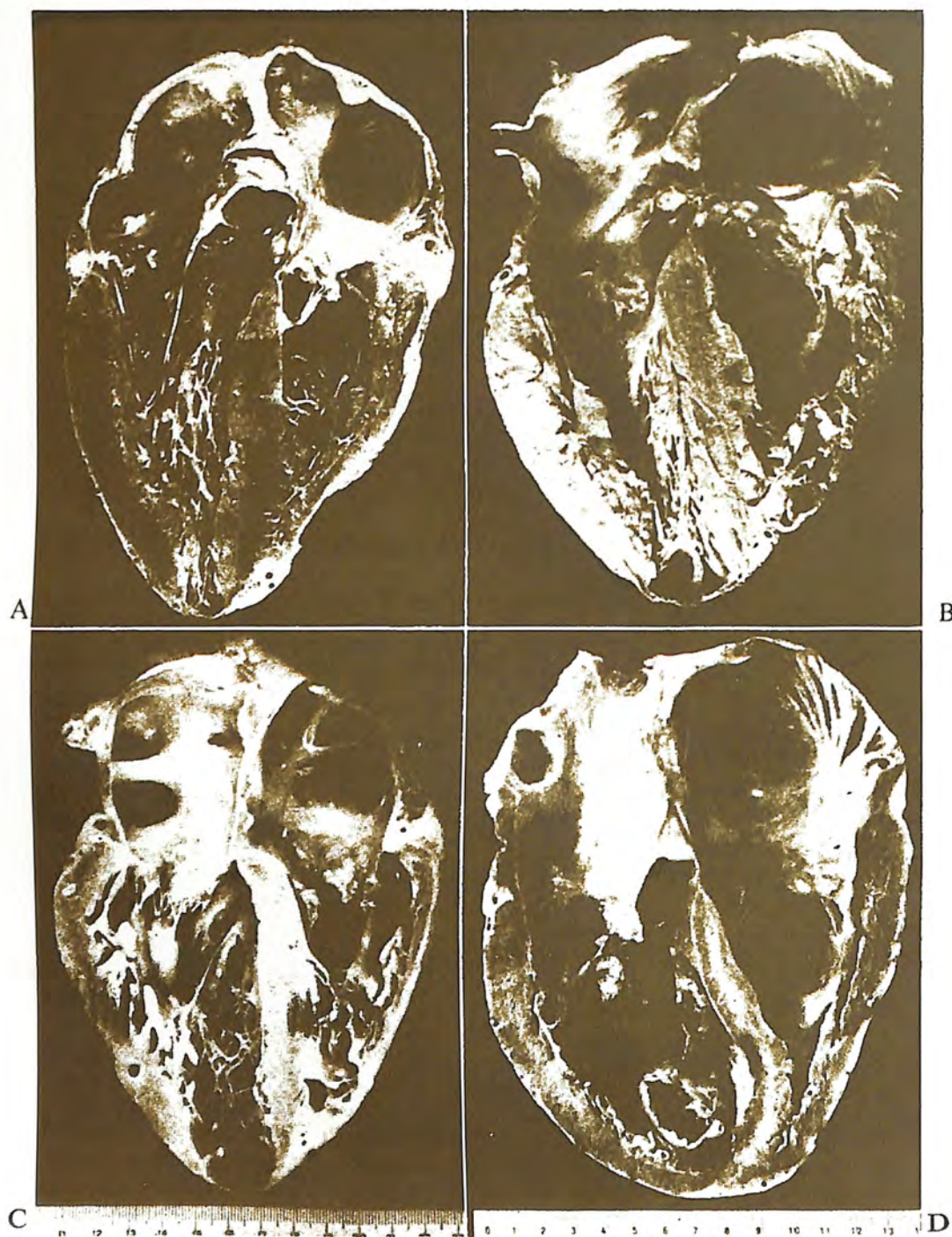



FIG. 19. Frontal section of chagasic hearts. A—small aneurysm at the left apex and slight hypertrophy of both ventricle walls. B—moderate aneurysm at the left apex and beginning aneurysm at the right ventricle, global hypertrophy and dilatation of the right atrium with thrombosis of the auricle. C—aneurysm of the left ventricle. D—cardiomegaly with global dilatation and parietal thrombosis in the left ventricle and right auricle.

according to the degree of the dilatation of the cavities, and to the secondary degenerative lesions of the myocardium. More than half of the chagasic hearts disclose a very odd alteration at the apex, which seems to be almost pathognomonic for the Chagas' cardiopathy, since it has never been found in any other cardiopathy. This lesion consists of a thinning and bulging of the apical region, mainly on the left ventricle, and it is known variously as: area of infarct in the apex of the left ventricle (Montes Pereja *et al.*, 1938), ventricular aneurysm (Romaña and Cossio, 1944; Moia *et al.*, 1955; Köberle, 1959), fibrous nodule of the apex (Ferreira-Beirutti, 1947), thinning of the apex (Freitas and Lima, 1950; Capriles *et al.*, 1962), necrotic lesion of the apex (Carvalhal *et al.*, 1954), apical lesion (Andrade, 1956), fibrosis of the apex of the left ventricle (Laranja *et al.*, 1956), atrophic lesion of the apex (Mignone, 1958) and vorticillar lesion of the apex (Raso, 1964).

I have adopted the term "aneurysm" for this lesion.

The diameter of this aneurysm never surpasses 5 cm; its wall may consist of the endocardium and pericardium only and then appears translucent. Similar aneurysmatic dilatation may occur less frequently at the right apex and rarely in the posterior wall of the left ventricle. Thrombosis of the aneurysm is very common. Even without aneurysm, extensive mural thrombosis in the lower part of the left ventricle may be seen, and in cases with cardiomegaly a massive thrombosis of the right auricle is almost obligatory. All phases of thrombi organization and final hyalinization can be found in the same heart. Thrombosis in the left auricle is uncommon. The presence of thrombi explains the so frequent thromboembolic phenomena occurring in the pulmonary and/or in the systemic circulation (Nussenzweig *et al.*, 1953; Andrade, 1959).

The myocardium of the lower part of the ventricles shows small fibrotic scars, rarely occupying large areas (as after myocardial infarction). Marked atrophy and slight fibrosis on the trabecula carneae of both apical regions, as well as in the papillary muscles of the left ventricle in cases of accentuated cardiomegaly, are frequent.

Extensive thrombosis of the lower half of the left ventricle almost completely replaced by fibrous tissue may give the impression of an endomyocardiofibrosis. However, while in the latter condition the fibrotic lesions tend to reduce the cavity beginning at the apex, in the former there is a tendency to enlarge the cavity in the apical portion.

The coronary arteries are dilated and with no arteriosclerotic alterations.

(c) *Histological findings.* On microscopic examination the myocardium shows hypertrophic muscle fibers intermingled with some atrophic muscle fibers and generally very discrete interstitial fibrosis. In some instances the fibrotic foci may appear to a greater extent, especially in the lower part of the ventricles and in the wall of the right atrium. Small inflammatory foci of monohistiocytic type and rare granulomas indicate the persistence of the parasitic disease. Beside these inflammatory reactions there may be found—not always but frequently—areas of intense lymphohistiocytic infiltration, sometimes containing certain numbers of eosinophils. Sarcolemma sheaths filled with inflammatory cells can be seen inside these infiltrates. Nests of leishmania may (rarely) be found in the center of the circumscribed or granulomatous inflam-

matory foci, but never in these large, more diffuse lymphohistiocytic infiltrates. It seems, therefore, that these latter reactions are not directly connected with the parasites. Parasitic pseudocysts are extremely rare and found only through the examination of a great number of histological sections.

The conduction system shows the same inflammatory and fibrotic lesions found in the myocardium (Andrade and Andrade, 1955; Köberle, 1957; Torres and Duarte, 1961; Oliveira, 1967).

The parasympathetic ganglion cells of the intrinsic cardiac nervous system reveal a marked numerical reduction (Köberle, 1956, 1957, 1959; Mott and Hagstrom, 1965; Reis, 1965).

Figure 20 shows the same phenomenon already demonstrated in the esophagus, i.e. an increase with age in the average number of ganglion cells.

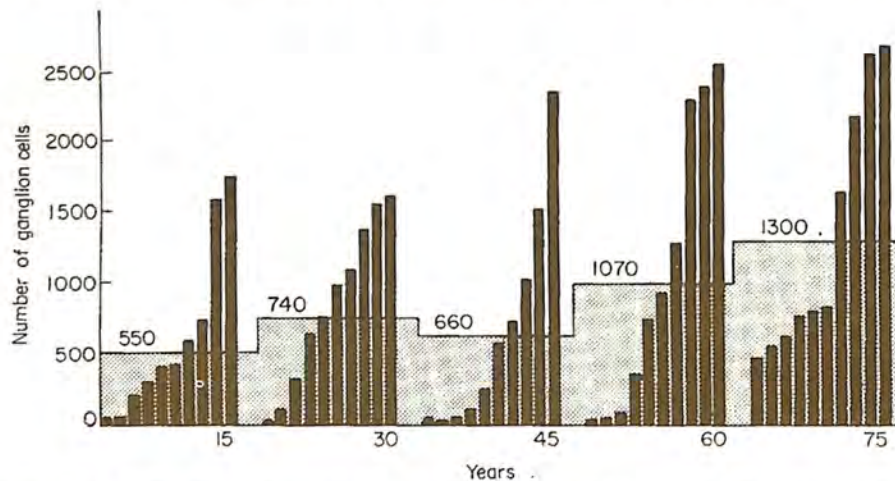



FIG. 20. Results of ganglion cell counting in 50 cases of Chagas' cardiopathy, showing an increase of the number of ganglion cells with age.

3. *Pathogenesis*

The symptomatology and pathology of the chronic chagasic cardiopathy are, without doubt, very unusual. In spite of the impossibility of explaining either the symptoms or the morphological findings as an inflammatory process of the myocardium, this heart disease was long, and is still regarded by many authors as a "chronic myocarditis". I consider the chagasic cardiopathy to be a neurogenic heart disease caused by the destruction of the ganglion cells in the heart.

As in other hollow muscular organs, we find in the chagasic heart a dilatation and hypertrophy without any plausible explanation. The blood pressure is surely not the cause of this hypertrophy because it is normal or lowered in chronic chagasic patients. Nor do the cardiac valves show alterations. The chagasic heart is deprived of its nervous control, losing the capacity of adaptation to the changes required by the environmental influences on the circulatory system as a whole. This incapacity of adaptation results in an increase of the residual blood in the heart chambers, i.e. a gradual dilatation of the cavities,

and therefore a distension of the heart muscle fibers. This distension finally leads to a hypertrophy of heart musculature. The same vicious circle of dilatation and hypertrophy prevails as was mentioned when discussing the pathogenesis of megaesophagus. Therefore, we are facing a "neurogenic dilatation and hypertrophy" of the heart.

Costa (1963a) demonstrated that the hypertrophy of the chronic chagasic heart is a consequence of its denervation. In his investigation, normal, chronic chagasic and atropinized rats were studied at rest and after being submitted to forced swimming during 3 weeks. In the group at rest no significant differences of the heart weight was noted. However, after swimming a significant difference of the hypertrophy of the heart was observed in all groups of rats (normal, chagasic and atropinized). The hypertrophy of the heart in the chagasic group was more marked than that of normal rats and still more marked in the atropinized group. This experiment demonstrates clearly that the hypertrophy of the heart is in accordance with the degree of its denervation, partial in the chagasic and complete in the pharmacologically denervated rats.

In most cases the hypertrophy and dilatation of the right heart is more pronounced than that of the left, and mainly the dilatation of the right atrium. This is understandable because the right heart is the first to receive the peripheral blood inflow and because it is not able to adapt itself to the variations of input. In most cases the symptomatology of the chagasic cardiopathy begins during the third decade, although the denervation occurred generally in the first years of life. We believe that the extraordinary capacity of adaptation of the infant's heart may explain this relatively long, asymptomatic interval.

The most impressive and characteristic morphological finding is the so-called aneurysm of the apex, already observed by Chagas (1916). There are three principal hypotheses attempting to explain the mechanism of its formation: (1) hypoxemic, (2) inflammatory and (3) mechanical.

Hypoxemic mechanism. The thinning of the wall is caused by ischemic necrosis or necrobiosis of the musculature. This ischemia was explained through lesions of the coronary vessels (Laranja *et al.*, 1951; Carvalhal *et al.*, 1954), associated with other factors. "In the enlarged heart, the vascular lesions and the dynamic factor usually operating in this condition (reduced systolic and pulse pressure, diminution of the capacity of the myocardium to raise systolic pressure, occurrence of frequent ectopic inefficient contracture) may result in coronary insufficiency" (Laranja *et al.*, 1956). Andrade and Andrade (1955) considered the parietal thrombosis in the apical region, which occludes the Thebesian veins, the cause of the ischemic necrosis at the apex. Köberle (1957, 1962) explained the hypoxemic necrosis through a relative coronary insufficiency. However, an analysis of 400 cases revealed that the hypoxemic alterations do not increase with the increase in weight of the muscular mass. So it seems more probable that the hypoxemia is a consequence of the disturbed innervation of the heart vessels. A definite proof of this mechanism does not yet exist.

Inflammatory mechanism. This hypothesis was used by Moia *et al.* (1955) and Mignone (1958) to explain the thinning of the wall. The destruction of the muscular wall by the inflammatory process is the primary factor involved. Local substitution by fibrous scar tissue follows, lessens resistance and favors the development of the apical lesion.

Mechanical hypothesis. According to Raso (1964) various conjoint factors (inflammation, denervation, diminution of muscular tonus) contribute to the formation of the "vorticillar lesion". The decisive factor would be a mechanical one causing the disappearance of the muscle at the vorticillar region through dislocation of the spino-spiral and bulbo-spiral muscle bundles. After this separation the endocardium becomes herniated and fuses with the epicardium.

Nowadays we believe that none of the above-mentioned theories explains satisfactorily the apical lesion. In fact, the "apical aneurysm" is not exclusively found at the apex, but sometimes in the anterior wall of the right ventricle as well as in the posterior or lateral wall of the left ventricle. Anyhow it is difficult to imagine a dislocation of the muscle bundles at these localizations.

Besides this very distinct apical lesion, there is another one, which sometimes is evident at first sight, and sometimes is only revealed after removal of the subepicardial fat tissue. It is the separation of the musculature of the left and right ventricle, originating an aspect of "cor bifidum". It seems to me that this separation into left and right heart is the morphological expression of the independent function of each ventricle, which results from the denervation. In about 50% of the cases of chagasic cardiopathy there is a right bundle branch block, which evidently disturbs the synchronous pulsation of the heart. Besides this, it was shown that the intact sympathetic innervation of the heart is essential for the synchronous contraction of the two ventricles (Priola and Randall, 1964). Recent studies of chagasic patients with and without cardiopathy, carried out in our University Hospital by Amorim *et al.* (1967) using several specialized methods and techniques, demonstrated that the chagasic heart without apparent cardiopathy behaves as a parasympathetic denervated organ. Hearts of chagasic patients with cardiopathy revealed a parasympathetic and sympathetic denervation. We have found that in chagasic patients with cardiopathy there are severe lesions and a numerical diminution of ganglion cells in the stellate ganglia.

The most characteristic EKG findings in chagasic cardiopathy are "alterations of the formation and conduction of stimuli" (Chagas and Villela, 1922). It is astonishing that in spite of this very categoric and precise characterization of the chagasic heart disease, no systematic studies of the conduction system of the heart have been attempted. Systematic examination of more than 50 chagasic hearts in my Department (Oliveira, 1967) revealed a discrepancy between the EKG findings and the histological alterations in several cases. Cases with complete A-V block did not show morphological alterations in the bundle of His which could explain the interrupted conduction. These negative results were not surprising since we know that mutability of the EKG changes (Brasil, 1956) is so characteristic of the chagasic cardiopathy. Therefore, the various blocks which appear and disappear at short intervals could not be caused by a definite morphological interruption of the conduction system. The mechanism of the EKG changes needs further investigation, mainly with regard to the influences of the intrinsic nervous system upon the conduction of stimuli.

Summarizing, we can say that the neurogenic chagasic cardiopathy is caused by more or less marked parasympathetic and sympathetic denervation, and as I indicated throughout this exposition, there are many obscure points in the

complex pathogenesis of this disease, which still represents a "new chapter of human pathology".

C. EXOCRINOPATHIES

It is obvious that a disease which alters such different territories of the nervous system can also provoke disturbances in the function of the glands which are under the control of the autonomic nervous system. There are only a few studies about clinical and morphological manifestations of the exocrine glands, some of them originally described by Chagas.

1. *Sialoadenopathy*

Chagas and Villela (1922) observed a symmetrical enlargement of the parotid gland which gives the patient's face a very typical configuration ("cat's face"). This hypertrophy is very frequent in cases of megaesophagus (33% of 1514 cases reported by Mineiro, 1958). The enlargement of the parotid gland with sialorrhea was considered a result of the difficulty in swallowing. Nowadays we know that this hypertrophy of the parotid has the same pathogenetic mechanism as the other Chagas' syndromes, i.e. a parasympathetic denervation. The hypertrophy was verified histologically by Vieira and Hadler (1961). Hyperamylasemia is a common finding in these patients (Vieira, 1961), and pharmacological studies (Vieira, 1964) showed that the salivary glands respond excessively to the application of pilocarpine, according to Cannon's law.

An interesting investigation on patients with megaesophagus and hypertrophy of the salivary glands was performed by Vieira *et al.* (1962). In these patients a subtotal esophagectomy (after Câmara Lopes) was performed and they were fed through a gastric tube. In the first post-operative period a marked decrease in volume of the previous enlarged parotid gland and a fall of serum amylase were observed. When in a second operation a cervical esophago-gastric anastomosis was performed and the patient was able to eat by mouth, the parotid glands enlarged again and the serum amylase increased. These observations demonstrate clearly that the salivary glands react to oral stimuli and not to reflexes originating from the esophagus. All salivary glands may show enlargement but this manifestation is more pronounced in the parotids.

2. *Hydroadenopathy*

A typical complaint of chagasic patients is an increased sudoresis and, sometimes, sweating episodes without any apparent cause. Vieira (1963) analyzed sweating from the quantitative point of view, using pilocarpine subcutaneously as the activating drug. He found a marked increase of sweating in chronic chagasic patients when compared with a group of normal individuals.

3. *Gastropathy*

A gastropathy in chagasic patients with a vague symptomatology, i.e. difficult digestion, sensation of plenitude, was described by Porto (1955). These complaints are partly caused by denervation of the gastric musculature which leads to difficulty in emptying, megagastria or "stomach in cascade" (Rezende,

1959); and partly by denervation of the gastric glands responsible for the associated hypochlorhydria (Vieira *et al.*, 1964a).

It is interesting that the denervated gastric glands do not show the expected supersensitivity of the denervated structures which could result in hyperchlorhydria. It seems that this fact is apparently an exception of Cannon's law of denervation. However, studying the gastric mucosa in chronic chagasic patients one finds a dedifferentiation of the epithelium and the fundic glands of the stomach, i.e. intestinalization of the gastric mucosa. The same phenomenon occurs in the high differentiated muscle fibers which fibrillate after denervation until their dedifferentiation, further behaving like smooth muscle fibers. The parietal cells of the fundic glands are highly differentiated, and it is probable that they become dedifferentiated like the striated muscle fibers.

D. ENDOCRINOPATHIES

Manifestations of the endocrine system were described by Chagas (1911), but they were not recognized for many years. Only recent systematic investigations on chagasic patients demonstrated alterations of glucose tolerance test (Reis, 1965) and variations in iodoproteinemia (Lomonaco, 1962). Histopathological studies have not yet been performed. It is known that abortion and premature birth are frequent in pregnant chagasic patients (Oliveira, 1958; Freitas, 1966), but we do not know the mechanism of such disturbances. Concerning the gonads an interesting study in patients with megacolon was made by Haddad *et al.* (1959). After rectosigmoidectomy many patients complained of impotency (males) and frigidity (females). The authors were able to verify that in most such cases these disorders were present long before surgical intervention and in only a few cases was there aggravation of the disturbance. Thus the symptomatology has to be ascribed to Chagas' disease itself. Studies in infected male animals showed diminution in the volume of semen (Ferreira and Oliveira, 1965) and severe alterations of the innervation of the testicles with reduction or inhibition of spermatogenesis (Ferreira, 1967).

E. ENCEPHALOPATHIES

Chagas (1913) described more than 200 cases of neurological manifestations of central origin and called this special chronic form of the disease "Forma Nervosa". Chagas referred to spastic diplegia, dysbasia, athetosis, aphasia, cerebellar ataxia, pseudobulbar paralysis, idiocy, infantilism, etc. and wrote:

> Concerning the frequency of the nervous forms of the trypanosomiasis we have made numerous observations which authorize us to affirm that this disease might be the one that, in human pathology, provokes the largest number of organic changes in the central nervous system.

Very few observations were reported afterwards (Moreira, 1925; Austregésilo, 1927; Borges-Fortes, 1942; Käfer *et al.*, 1961). During the last decade this aspect of the *T. cruzi* infection was studied in animals infected experimentally. Depopulation in nerve cells of the diencephalon and cerebellum was noted by Jardim (1962). Brandão and Zulian (1966) verified a diminution of the number

of Purkinje cells in the cerebellum in chronic chagasic patients. In one case with cerebellar symptomatology the diminution was 95% of the average number found in normal cases. Alencar (1964) observed a reduction in the number of ganglion cells in the cerebral cortex in chronic chagasic cardiopaths, attributing his findings to a chronic hypoxemia of the brain. I cannot agree with such an interpretation, because ganglion cell destruction during acute Chagas' disease is nowadays sufficiently proven. Recently Armbrust-Figueiredo (1967) called attention to the difficulties of diagnosis of the central nervous system form and to the necessity of performing systematic studies in this forgotten field.

F. MYELOPATHIES

Observations on Chagas' myelopathy were done only in experimentally infected rats by Schwartzburd and Köberle (1959), and they found a marked reduction of the ganglion cells, principally in the lumbar segments of the spinal cord. Pains and some weakness of the musculature of the legs are frequently observed in chronic chagasic patients and are probably related to nerve-cell lesions in the spinal cord. Systematic studies are needed to evaluate the importance of the involvement in this part of the nervous system.

With the enumeration of these syndromes, I have not exhausted the symptomatology of American Trypanosomiasis. Various metabolic alterations and disturbances of intestinal absorption have been studied (Vieira *et al.*, 1966; Campos and Cançado, 1962; Reis and Vichi, 1965; Vieira and Meneghelli, 1966; Meneghelli and Reis, 1967), indicating that practically all homeostatic mechanisms of the organism may be altered to some degree by the *T. cruzi* infection.

VII. Conclusions

The discovery of American trypanosomiasis by Carlos Chagas represents one of the most fascinating events in the history of medicine.

As a rule, the etiological agent sought and demonstrated after a disease is already well known. Peculiarly enough, the reverse path was followed by Chagas! He discovered a parasite in the intestine of a blood-sucking bug, which suggested to him, through an unexplained lucubration, the possible existence of a new disease of animals and human beings sucked by the supposed transmitter. It is almost incredible that such severe pathological manifestations, which represent the "causa mortis" of one third of our autopsy material, would have been overlooked or unknown before Chagas' unique discovery. In fact, many of these manifestations were well known long before the discovery of American trypanosomiasis and not etiologically correlated with it after its discovery. It is interesting that one of these manifestations, which in chagasic etiology was most obstinately denied and is disputed even today—namely the megaesophagus—had already been described (250 years ago) as a widespread plague in the State of Pernambuco (Brazil).

We owe our first knowledge about megaesophagus to the famous English scientist Sir Thomas Willis (1670), who described in his "Pharmaceutice Rationalis" a single case of this syndrome. A second isolated case was published by Blasius (1677), the translator of Willis' work. Whereas in the following two centuries cases of megaesophagus appeared now and then as rarities in the European medical literature, the Brazilian quack Miguel Dias Pimenta (1707) gave a minutiose description of this frequent disease in Pernambuco, recommending its prevention and treatment, considering it to be of parasitic etiology. References on dysphagia as endemic disease in various parts of Brazil are frequent in medical and lay literature, under several peculiar denominations.

A report on Chagas' disease will be incomplete without reference to the most illustrious victim of this illness. Even knowing that it is impossible to prove, we are convinced that Charles Darwin acquired Chagas' disease in Argentina or Chile during his scientific expedition and suffered from Chagas' syndrome until his death. This opinion was suggested first by Adler (1959) and reinforced by Kohn (1963). Those who are acquainted with the biography of Darwin on the one hand and with the various complaints of chagasic patients on the other, accept without hesitation the "posthumous" diagnosis for Darwin's chronic ill-health. The history of Darwin's disease is impressively similar to many histories of chagasic patients; it happens even today that their vague, singular and intense complaints are not properly evaluated and are simply taken to be psychoneurotic symptoms. However, physicians working in endemic areas and familiarized with the plague, consider the chagasic patient as a neurotic. Some skilful physicians are even able to diagnose the disease according to the patient's behavior when entering their office. In fact, the chagasic patient presents a pleiomorphic symptomatology from subtle to severe homeostatic disturbances, turning him into an apparently "neurotic" individual. However, through our investigations we have demonstrated that all these alterations have morphological bases characterized by nerve cell damage of varying degrees. Thus the chagasic patient is really a neuropath, i.e. an individual with well defined organic lesions in different territories of his nervous system.

Finally, American trypanosomiasis shows us a very peculiar pathology of homeostasis of the human organism, and represents even today a new realm in pathology, which becomes understandable through Cannon's law of denervation.

References

Adler, S. (1959). Darwin's illness. *Nature, Lond.* **184**, 1102–1103.

Alcântara, F. G. (1959). Experimentelle chagascardiopathie. *Z. Tropenmed. Parasit.* **10**, 296–305.

Alcântara, F. G. (1966). Transmissão experimental do Trypanosoma cruzi a camundongos pelo pernilongo Culex fatigans. *O Hospital* **69**, 27–30.

Alencar, A. (1964). Atrofia cortical na cardiopatia chagásica crônica. *O Hospital* **66**, 807–815.

Amorim, D. S., Godoy, R. A., Manço, J. M., Tanaka, A. and Gallo, L. Jr. (1967). Haemodynamics in Chagas' disease. *Archos bras. Cardiol.* (in press).

Andrade, Z. (1956). A lesão apical do coração na miocardite crônica chagásica. *O Hospital* **50**, 59–72.

Andrade, Z. (1959). Fenômenos trombo-embólicos na cardiopatia chagásica (1959). *Ann. Congr. Int. Doença de Chagas, Rio de Janeiro* **1**, 73–84.

Andrade, Z. and Andrade, S. (1955). A patologia da doença de Chagas. *Boln Fund. Gonçalo Moniz*, **6**, 1–52.

Armbrust-Figueiredo, J. (1967). Chagas' disease. Central nervous system involvement. II. *Congr. Panam. Neurologia, P. Rico*, October, 22–28.

Austregésilo, A. (1927). Formes nerveuses de la maladie de Chagas. *Revue Neurol.* **1**, 1–21.

Blasius, G. (1677). "Observationes medicae rariores". Amsterdam.

Bodian, M., Stephens, F. D. and Ward, B. C. H. (1949). Hirschsprung's disease and idiopathic megacolon. *Lancet* **251**, 11.

Borges-Fortes, A. (1942). As lesões do systema nervoso na enfermidade de Chagas. *Jorn. Clin., Rio de J.* **23**, 353–361.

Brandão, H. S. J. and Köberle, F. (1964). O apendice cecal na moléstia de Chagas. *Revta bras. Med.* **21**, 611–613.

Brandão, H. S. J. and Zulian, R. (1966). Nerve cell depopulation in chronic Chagas' disease. *Revta Inst. Med. trop. S. Paulo* **8**, 281–286.

Brasil, A. (1953). A mutabilidade eletrocardiográfica na cardiopatia chagásica crônica. *Revta Asoc. Med. Minas Gerais* **4**, 149–152.

Brasil, A. (1956). Etiopatogenia da aperistalsis do esófago. *Revta bras. Med.* **13**, 577–590.

Brito, T. and Vasconcelos, E. (1959). Necrotizing arteriitis in megaesophagus. *Revta Inst. Med. trop. S. Paulo* **1**, 195–206.

Brumpt, E. (1913). Immunité partielle dans les infections a Trypanosoma cruzi, transmission de ce trypanosome par Cimex rotundadus. *Bull. Path. Exot.* **6**, 172–176.

Camara-Lopes, L. H. (1962). The endemic South-american megaesophagus. *2nd World Congr. Gastroent.* **1**, 79–85. (München 1962).

Campos, J. O. and Cançado, J. R. (1962). Curvas glicêmicas anormais observadas em pacientes com a forma crônica da moléstia de Chagas. *O Hospital* **62**, 275–278.

Capriles, M. A., Berrios, G., Guevar, J. M. and Gomez, E. (1962). Complicaciones tromboembólicas en la cardiopatia crónica de Chagas. *Archos Hosp. Vargas* **4**, 293–298.

Carvalhal, S., Campos Filho, C. M., Portugal, O., Ramos, O., Paladino, N., Uvo, D., Younes, A. and Geabra, M. (1954). Alterações do complexo QRS nas derivações precordiais e seu substrato anatômico em pacientes portadores da miocardite chagásica crônica. *Revta. paul. Med.* **45**, 161–168.

Carvalho, M. M. (1950). Mal disfágico cárdio-esofágico. Coimbra. Imprensa de Coimbra, Limitada.

Chagas, C. (1909). Nova tripanosomiase humana. *Mem: Inst. Oswaldo Cruz* **1**, 159–218.

Chagas, C. (1911). Moléstia de Chagas ou thyreoidite parasitaria. Tipografia Leuzinger, Rio de Janeiro, Brazil.

Chagas, C. (1913). Les formes nerveuses d'une Nouvelle Trypanosomiase. *Nouv. Iconogr. Salpêtr.* **26**, 1–8.

Chagas, C. (1916). Tripanosomiase americana. Forma aguda da moléstia. *Mems. Inst. Oswaldo Cruz* **8**, 37–60.

Chagas, C. (1918). Epidemiologia da tripanosomiase americana. *Bras.-méd.* **32**, 213–214.

Chagas, C. and Villela, E. (1922). Forma cardíaca da tripanosomiase americana. *Mems. Inst. Oswaldo Cruz* **14**, 5–61.

Ciconelli, A. (1963). Estudo quantitativo dos neuronios do plexo hipogástrico inferior em ratos normais e em infectados pelo Trypanosoma cruzi. *Inaug. Diss. Fac. Med. Ribeirao Prêto.*

Ciconelli, A. (1964). Personal communication.

Costa, R. B. (1963a) Hipertrofia cardíaca em ratos chagásicos e ratos atropinizados. *Inaug. Diss. Fac. Med. Ribeirão Prêto.*

Costa, R. B. (1963b). Plexos submucosos e mientérico do cólon na moléstia de Chagas. *XV. Congr. bras. Gastroent. Goiania.*

Costa, R. B. and Alcântara, F. G. (1965). Gastropatia chagásica crónica. *Revta. bras. Med.* **22**, 667–671.

Costa, R. B. and Alcântara, F. G. (1966). Duodenopatia chagásica. *Revta. Bras. Med.* **23**, 158–166.

Crowell, B. C. (1923). Acute form of American trypanosomiasis; notes on its pathology, with autopsy report and observations on Trypanosomiasis cruzi in animals. *Am. J. trop. Med. Hyg.* **3**, 197–202.

Dalla Valle, A. (1920). Richerche istologiche su di un caso di megacolon congenito. *Pediatria, Rio de J.* **28**, 740–752.

Dalla Valle, A. (1924). Contributo alla conoscenca della forma famigliare del megacolon congenito. *Pediatria, Rio de J.* **32**, 569–599.

Dao, L. L. (1949). Observacion sobre enfermidad de Chagas congenita. *Revta Policlin., Caracas* **18**, 17–32.

Davis, D. J. (1943). An improved antigen for complement fixation in american trypanosomiasis. *Publ. Hlth. Rep., Wash.* **58**, 775–777.

Faulkner, W. B. Jr. (1940). Objective esophageal changes due to psychic factors. *Am. J. Med. Sci.* **200**, 796–799.

Ferreira, A. (1967). Personal communication.

Ferreira, A. and Oliveira, J. S. M. (1965). Volumen do sêmen obtido por eletroejaculação de ratos chagásicos (inoculados experimentalmente). *Revta. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **7**, 127–130.

Ferreira-Beirutti, P. (1947). Anatomia patologica de la enfermidad de Chagas. *Anales de la Clin. Méd. "A"* **4**, 523–593.

Freitas, J. L. P. (1966). Personal communication.

Freitas, J. L. P. and Almeida, J. O. (1949). Nova técnica de fixação de complemento para moléstia de Chagas. *O. Hospital* **35**, 787–800.

Freitas, J. L. P. and Lima, F. X. P. (1950). Sobre a transmissão intrauterina da infecção pelo Trypanosoma cruzi. *Revta Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. S. Paulo* **5**, 1–8.

Freitas, J. L. P., Amato Neto, V., Sonntag, R., Biancalana, A., Nussenzweig, V. and Barreto, J. G. (1952). Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homen por transfusão de sangue. *Revta Paul. Med.* **40**, 36–40.

Gavaller, B. (1951). Enfermedad de Chagas congenita. *Boln Matern. "Concepcion Palácios"* **4**, 59–64.

Godoy, R. A. (1963). Hipersensibilidade da musculatura brónquica a metacolina na forma crônica da moléstia de Chagas. *Inaug. Diss. Fac. Med. Ribeirão Prêto.*

Godoy, R. A. and Haddad, N. (1961). Tempo de transito esofágico em portadores de moléstia de Chagas. Anais I, *Congr. int. Doença de Chagas.* **2**, 591–601.

Hacker, H. von (1907). Handbuch der praktischen Chirurgie II.

Haddad, N. and Godoy, R. A. (1963). Valor da medida do tempo de transito esofácico como meio de diagnostico precoce de disperistalse de esófago em individuos chagásicos. *Revta Goiana Med.* **9**, 45–51.

Haddad, J., Raia and Erhart, E. A. (1959). Estudo das atividades sexuais nos pacientes portadores de megacolon, antes e após retosigmoidectomia abdominoperineal. *Revta Paul. Med.* **55**, 343–354.

Handford, H. (1888). Dilatation of the oesophagus. *Trans. path. Soc. Lond.* **39**, 103–105.

Hirschsprung, H. (1888). Stuhlträgheit Neugeborener infolge von Dilatation und Hypertrophie des Colons. *Jb. Kinderheilk.* **27**, 1–7.

Hoff, F. (1953). "Klinische Physiologie und Pathologie". Georg Thieme, Stuttgart.

Hurst, A. F. and Rake, G. H. (1930). Achalasia of the cardia. *Q. Jl Med.* **23**, 491–508.

Iñiguez-Montenegro, C. (1961). Transito esofágico na mólestia de Chagas. IV. Reun. Cient. Ass. Latinamer. *Cienc. Fisiol. Ribeirão Preto.*

Jackson, C. (1922). The diaphragmatic pinchcock in so-called "cardiospasm". *Laryngoscope, St. Louis* **32**, 139–146.

Jardim, E. (1962). Alterações quantitativas das celulas de Purkinje na fase aguda da moléstia de Chagas experimental im no camundongo. *Inaug. Diss. Fac. Med. Ribeirão Preto.*

Käfer, J. P., Monteverde, D. A., Blanco, E. F. and Tarsia, R. (1961). Las manifestaciones neurologicas en la forma crónica de la enfermedad de Chagas. *Revta Neurol. B. Aires* **9**, 199–211.

Köberle, F. (1956). Die Chagaskrankheit—eine Erkrankung der neurovegetativen Peripherie. *Wien. Klin. Wschr.* **68**, 333–339.

Köberle, F. (1957). Über Enteromegalie. *Zentbl. allg. Path. path. Anat.* **96**, 244–259.

Köberle, F. (1959). Die Chagaskrankheit—ihre Pathogenese und ihre Bedeutung als Volksseuche. *Z. Tropenmed. Parasit.* **10**, 236–267.

Köberle, F. (1962). Quantitative Pathologie des vegetativen Nervensystems. *Wien. Klin.-ther. Wschr.* **74**, 144–151.

Köberle, F. (1963). Patogenia do megaesôfago brasileiro e europeu. *Revta Goiana Med.* **9**, 79–116.

Kohn, L. A. (1963). Charles Darwin's chronic ill health. *Bull. Hist. Med.* **37**, 239–256.

Kollert, W. (1960). Sobre o culivo do Trypanosoma cruzi em cultura de tecido. *O Hospital* **58**, 23–24.

Kraus, R. (1915). Kropf, Kretinismus und die Krankheit von Chagas. *Wien. Klin. Wschr.* **28**, 942–945.

Laranja, F. S. (1954). Evolucion de los conocimientos sobre la cardiopatia de la enfermedad de Chagas. Imprenta Nacional, Caracas.

Laranja, F. S., Dias, E. and Nobrega, G. (1948). Clinica e terapeutica da doença de Chagas. *Revta bras. Med.* **5**, 738–749.

Laranja, F. S., Dias, E. and Nobrega, G. (1951). Clinica y terapeutica de la enfermedad de Chagas. *Prensa méd. Argent.* **38**, 465–484.

Laranja, F. S., Dias, E., Nobrega, G. and Miranda, A. (1956). Chagas' disease, a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* **14**, 1035–1060.

Lauar, K. M., Oliveira, A. R. and Rezende, J. M. (1959). Valor do tempo de esvaziamento esofagiano no diagnostico da esofagopatia chagásica. *Revta Goiana Med.* **5**, 97–102.

Lee, C. M. and Bebb, K. C. (1951). The pathogenesis and clinical management of megacolon with emphasis on the fallacy of the term "idiopathic". *Surgery* **30**, 1026–1048.

Lima, A. B. and Rassi, A. (1962). Chagas' disease. *In* "Cardiology", Vol. 3 (Luisada, A. A.). Suppl. 1, 100–119. McGraw-Hill Book Comp. Inc., New York.

Lomonaco, D. A. (1962). Estudo da função tireoideana na forma crônica da molestia de Chagas. *Inaug. Diss. Fac. Med. Ribeirão Prêto.*

Lotheissen, G. (1926). *In* "Chirurgie der Speiseröhre" (V. v. Hacker). Verlag, Enke Stuttgart.

Magalhães, O. (1944). Un poco de la vida de Carlos Chagas. *Revta Circulo méd. Mendoza* **63**, 9–15.

Manço, J. M., Godoy, R. A., Gallo Jr., L. and Amorim, d. S. (1967). Resposta ventiladóra a metacolina na forma crônica da doença de Chagas. *Archos. bras. Cardiol.* **20**, 175–178.

Mayer, M. and Rocha Lima, H. (1912). Zur Entwicklung von Schizotrypanum cruzi in Säugetieren. *Arch. Schiffs- u. Tropenhyg.* **17**, 376–380.

Mayer, M. and Rocha Lima, H. (1914). Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in Warmblütern und Arthropoden. *Arch. Schiffs- u. Tropenhyg.* **18**, 101–136.

Mazza, S. (1934). Casos agudos benignos de enfermedad de Chagas comprobados en la provincia de Jujuy. *MEPRA* **17**, 3–11.

Mazza, S., Montaña, A., Benitez, C. and Janzi, E. Z. (1936). Transmissión des Schizotrypanum cruzi al niño por leche de la madre com enfermedad de Chagas. *MEPRA* **28**, 41–46.

Meneghelli, U. G. and Reis, L. C. F. (1967). Estudos sôbre o metabolismo dos hidratos de carbono na moléstia de Chagas. *Revta méd. bras.* **13**, 4–10.

Meyer, H., Oliveira Musachio, M. and Andrade Mendoça, I. (1958). Electron microscopic study of Trypanosoma cruzi in thin sections of infected tissue culture and of blood-agar forms. *Parasitology* **48**, 1–9.

Mignone, C. (1958). Alguns aspectos da anatomia patológica da cardite chagásica crônica. *Fac. Med.* São Paulo.

Mikulicz, J. von (1904). Zur Pathologie und Therapie des Kardiospasmus. *Dt. med. Wschr.* **30**, 15–17.

Mineiro, V. (1958). Contribuição a etiologia do megaesôfago. *Revta Goiana Med.* **4**, 29–37.

Moia, B., Rosenbaum, M. B. and Hoyman, D. (1955). Aneurysmas ventriculares en la miocarditis crónica chagásica. *Revta Argent. Cardiol.* **22**, 113–115.

Molitor, W. (1962). Der heutige Stand unserer Kenntnisse über den normalen Cardiamechanismus. *Inaug. Diss. Med. Fak. Bonn.*

Mönckeberg, J. G. (1924). Die Erkrankungen des Myokards und des spezifischen Muskelsystems. *Handb. spez. Path. Anat. u. Hist.* **2**, 246. Springer Verlag, Berlin.

Montes Pereja, J., Amargos, A., Estable, J. J. and Ferreira Beirutti, P. (1938). Forma cardiaca de la tripanosomiasis cruzi. *Archos Urug. Cardiol.* **2**, 119–132.

Morales Rojas, G., Fuenmayor, R. G., Acevedo, G. F., Capriles, M. A. and Gonzáles, A. R. (1961). Manifestaciones digestivas en pacientes chagásicos. *Archos Hosp. Vargas* **3**, 179–187.

Moreira, J. V. C. (1925). A forma nervosa da moléstia de Chagas. *Inaug. Diss. Fac. Med. Rio de Janeiro.*

Mosher, H. P. (1922). Liver tunnel and cardiospasm. *Laryngoscope* **32**, 348–351.

Mosher, H. P. (1933). Involvement of the oesophagus in acute and chronic infection. *Arch. Otolaryn.* **18**, 563–598.

Mosher, H. P. and McGregor, G. W. (1928). A study of the lower end of the oesophagus. *Ann. Otol. Rhinol. Lar.* **37**, 12–70.

Mott, E. K. and Hagstrom, J. W. C. (1965). The pathologic lesions of the cardiac autonomic nervous system in chronic Chagas' myocarditis. *Circulation* **31**, 273–286.

Muniz, J. and Azevedo, A. P. (1947). Novo conceito da patogenia da doença de Chagas. *Mems Inst. Oswaldo Cruz* **45**, 261–267.

Mya, G. (1894). Due observazione di dilatazione ed hypertrofia congenita del colon. *Sperimentale* **48**, 215–231.

Nussenzweig, I., França Netto, A. S., Wajchemberg, B. L., Timoner, J., Macruz, J. and Serra Azul, L. G. (1953). Acidentes cerebrais vasculares embólicos na cardiopatia chagásica crônica. *Archos bras. Neuriat. Psychiat.* **11**, 386–402.

Okumura, M., Brito, T., Silva, L. H. P., Silva, A. C. and Correa Neto, A. (1960). The pathology of experimental Chagas' disease in mice. Digestive tract changes with a reference to necrotizing arteritis. *Revta Inst. Med. Trop. S. Paulo* **2**, 17–28.

Okumura, M., Correa Neto, A. and Silva, A. C. (1962). Contribuição para o estudo da patogenia das lesões vasculares na doença de Chagas experimental em camundongos brancos. *Revta Paul. Med.* **61**, 265–266.

Oliveira, F. C. (1958). A doença de Chagas no ciclo gravídico puerperal. *Dis. Doc. Fac.* Nacional Brasil.

Oliveira, J. A. M. (1967). Personal communication.

Pereira, P. F. and Gonçalves, R. P. (1958). Megaesôfago chagásico; hipertrofia ou hiperplasia? *Revta goiana Med.* **4**, 17–28.

Pessôa, J. and Mesquita, C. (1964). Personal communication.

Piaget, F. and Fouillet, J. (1959). Le pharynx et l'oesophage sénile. *L. Med. Lyon* **955**, 951–967.

Pimenta, M. D. (1707). Noticias do que he o achaque do bicho. *Off. M. Manescal*, Lisboa.

Porto, C. (1955). Gastropatia chagásica. *Revta goiana Med.* **1**, 43–54.

Prado, A. A. (1959). Doença de Chagas. *An. Congr. Int. Doença de Chagas, Rio de Janeiro* **2**, 1257–1316.

Priola, C. V. and Randall, W. C. (1964). Alterations in cardiac synchrony induced by the cardiac sympathetic nerves. *Circulation Res.* **15**, 463–472.

Raso, P. (1964). Contribuição ao estudo da lesão vorticilar na cardite chagásica crônica. *Inaug. Diss. Fac. Med. Belo Horizonte.*

Reis, L. C. F. (1965). Estudos sôbre o metabolismo dos hidratos de carbono na moléstia de Chagas. *Revta Ass. méd. bras.* **11**, 3–7.

Reis, L. C. F. and Vichi, F. L. (1965). Estudos sôbre o metabolismo dos hidratos de carbono na moléstia de Chagas. *Revta Ass. méd. bras.* **11**, 61–65.

Rezende, J. M. (1959). Forma digestiva da moléstia de Chagas. *Revta goiana Med.* **5**, 193–227.

Rezende, J. M. (1963). The endemic South-American megaoesophagus. *Congr. int. Gastroent.* **2**, 60–74. Verlag Karger, Basel, New York.

Rezende, J. M. (1966). Personal communication.

Rezende, J. M. and Rassi, A. (1958). Comprometimento do esôfago na moléstia de Chagas. Megaesôfago e cardiopatia. *O Hospital* **53**, 1–16.

Rohwedder, R. (1967). Personal communication.

Romaña, C. (1963). Enfermedad de Chagas, Buenos Aires.

Romaña, C. and Cossio, F. (1944). Formas crónicas cardiacas de la enfermedad de Chagas. *An. Inst. Med. reg., Tucumán* **1**, 9–91.

Romaña, C. and Meyer, H. (1942). Estudo do ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi em cultura de tecido de embrião de galinha. *Mems Inst. Oswaldo Cruz* **37**, 19–27.

Sauerbruch, F. and Hacker, H. von (1906). Zur Frage des Cardiaverschlusses der Speiseröhre. *Dt. med. Wschr.* **32**, 1236–1271.

Schwartzburd, H. and Köberle, F. (1959). Chagas-Myelopathie. *Z. Tropenmed. Parasit.* **10**, 309–314.

Soergel, K. H., Zobralske, F. F. and Amberg, J. R. (1964). Presbyesophagus. Esophagus' motility in nonagenarians. *J. clin. Invest.* **43**, 1472–1479.

Souza, C. A. (1966). Estudo radiologico da bronquopatia chagàsica. *Revta paul. Med.* **68**, 183–184.

Tafuri, W. (1967). Personal communication.

Torres, C. B. M. (1941). Sobre a anatomia patologica da doença de Chagas. *Mems Inst. Oswaldo Cruz* **36**, 391–404.

Torres, C. B. M. and Duarte, E. (1961). O nódulo atrioventricular e o feixe de His no Homen. *Mems. Inst. Oswaldo Cruz* **59**, 303–324.

Turano, L. (1959). Radiologische Physiologie des Oesophagus. *Fortschr. Röntgenstr.* **90**, 527–35.

Viana Martins, A., Versiani, V. and Tupinambá, A. A. (1940). Sobre 25 casos agudos de moléstia de Chagas obsèrvados em Minas Gerais. *Mem. Inst. E. Dias* **3**, 5–51.

Vianna, G. (1911). Contribuição para o estudo da anatomia patologica da moléstia de Chagas. *Mems Inst. Oswaldo Cruz* **3**, 276–293.

Vieira, C. B. (1961). Hyperamylasaemia and hyperactivity of salivary glands associated with megaoesophagus. *Am. J. dig. Dis.* **6**, 722–741.

Vieira, C. B. (1963). Hipersudação provocada pela pilocarpina na moléstia de Chagas crônica. *O Hospital* **64**, 1335–1345.

Vieira, C. B. (1964). A prova da pilocarpina no megaesôfago. *Ann. Cong. Int. Doença de Chagas, Rio de Janeiro* **5**, 1693–1697.

Vieira, C. B. and Godoy, R. A. (1963). Resposta motora do esôfago não ectásico a agentes colinérgicos na moléstia de Chagas. *Revta goiana med.* **9**, 21–28.

Vieira, C. B. and Hadler, W. A. (1961). Estudo histológico da glandula parótida e do pancreas no megaesôfago. *Revta Asoc. méd. bras.* **7**, 89–96.

Vieira, C. B. and Meneghelli, U. G. (1966). A absorção de gordura em portadores da forma crônica da moléstia de Chagas e sua correlação com a prova oral de tolerância a glicose. *O Hospital* **69**, 575–583.

Vieira, C. B., Camara-Lopes, L. H. and Menegucci, W. (1962). Variaçoes de volume das glandulas salivares e de amilasemia em pacientes com megaesôfago chagásico operado. *Revta goiana med.* **8**, 11–19.

Vieira, C. B., Godoy, R. A. and Meneghelli, U. G. (1964a). Aspectos da secreção gastrica na forma crônica da molestia de Chagas. *O Hospital* **65**, 1345–1349.

Vieira, C. B., Godoy, R. A. and Carril, C. F. (1964b). Hypersensitivity of the large intestine to cholinergic agents in patients with Chagas' disease and megacolon. *Revta bras. Gastroenterol.* **16**, 41–48.

Vieira, C. B., Mazzoncini, M. and Lomonaco, D. A. (1965). Variações de potassemia na forma crônica da molestia de Chagas. *Revta paul. Med.* **66**, 239–241.

Vieira, C. B., Godoy, R. A., Meneghelli, U. G. and Carril, C. F. (1966). Resposta do colon sigmoide não ectásico a metacolina na forma crônica da moléstia de Chagas. *Archos Gastroent. Nutr.* **3**, 21–29.

WHO Report (1962). Report of the advisory group on research in Chagas' disease. *Res.* **1**, 15.

Willis, T. (1670). Pharmaceutica rationalis, London.

Wolf, St. and Almy, T. P. (1949). Experimental observation on cardiospasm in man. *Gastroenterology* **13**, 400–421.

Wolf, A., Kabat, E. A., Bezer, A. E. and Fonseca, J. R. C. (1953). "The effect of cortisone in activating latent trypanosomiasis in Rhesus monkeys". Columbia University Press, New York.

Zweigel, J. C. (1733). De spasmis gulae inferioris et de nausea. *Inaug. Diss. Med. Fak.* Halle.

Fritz Koeberle: visão da ciência pelo microscópio

Claude Pirmez
Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Medicas
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Fritz Koeberle, nascido em 1910, na Áustria, veio para o Brasil em 1953 para integrar-se ao Centro de Pesquisa e Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em São Paulo. Ali, fascinado pela doença que não conhecia, deparou-se com uma enormidade de casos de doença de Chagas, e a licença para ficar no país somente por três anos transformou-se na transferência definitiva para o país, inclusive com naturalização como cidadão brasileiro (Rezende, 2000).

Francisco Laranja, por um lado, e Koeberle, por outro, dividiram os estudos da doença de Chagas em períodos: o primeiro compreende os relatos sobre o quadro clínico feitos por Carlos Chagas, com a definição das formas agudas e crônicas, chamando a atenção para os distúrbios cardíacos; segue-se uma fase de "esquecimento", até 1940, em que, apesar das várias descrições de casos agudos no continente americano, não houve real compreensão do impacto que essa doença poderia ter na saúde pública; finalmente, a partir dos anos 50, e particularmente nessa década, vê-se uma enorme riqueza de trabalhos científicos, produto de diversos pesquisadores, entre os quais Koeberle. A fase de "redescoberta" se dá na Argentina, por intermédio de Salvador Mazza, que, apesar de também ter sido alvo de críticas dos colegas, persistiu no estudo e mostrou o significado da doença na saúde pública (Mazza, 1934). A fase que Koeberle denominou de "reabilitação" é resultado do aparecimento do teste de fixação de complemento, que foi usado ainda por pelo menos trinta anos após essa descrição. A segunda metade do século XX de fato contou com imensa contribuição dos patologistas; inúmeros trabalhos experimentais em modelos murinos e, em menor escala, em outros animais como cães e macacos concorreram em grande medida para a compreensão da patogênese da doença, ampliando os estudos originais de Gaspar Vianna e de Magarinos Torres (Torres, 1917; Vianna, 1911).

Koeberle buscou exaustivamente, até encontrar, parasitas na parede do esôfago, com o propósito de comprovar os dados de Chagas (Köberle & Nador, 1955). As dilatações do trato gastroentérico representavam uma entidade rara fora da América do Sul e muitos

duvidavam da etiologia chagásica, uma vez que não havia comprovação anatomopatológica. Seus achados suscitaram a revisão da classificação das formas clínicas, que passou a incluir a forma digestiva como entidade distinta e individualizada. O artigo "Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis", publicado em 1968 na revista *Advances in Parasitology*, é a descrição da teoria que construiu com base nas observações histopatológicas nas mais de mil necropsias e muitas centenas de biopsias de casos do Brasil Central que encontrou no Departamento de Patologia da Universidade de Ribeirão Preto. No artigo, escrito em um formato dissertativo, Köberle lança sua opinião pessoal, em estilo comum à época e influenciado por uma visão européia da ciência, em contraste com a objetividade pragmática anglo-saxônica que surgia de forma mais consistente a partir dos anos 50. Esse estilo em prosa é, talvez, fácil de ser encontrado no mundo da patologia, cujo traço mais marcante é a descrição minuciosa da doença.

Nessa revisão, Koeberle avalia que as reações inflamatórias na doença de Chagas não seguem o padrão esperado pelos princípios gerais de patologia. Define a fase aguda como "septicemica aguda", que evolui para um quadro de pauciparasitismo, clinicamente silencioso, como resultado da mobilização da defesa específica. Sustenta essa linha de pensamento nos ensaios realizados em 1953 por Wolf (*apud* Köberle, 1968), que mostrou a ocorrência de um desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro quando administrou cortisona em animais experimentais infectados. A recrudescência da parasitemia quando se induz a imunossupressão mostra de forma clara a importância da resposta imune no controle da infecção, e foi posteriormente confirmada experimentalmente em diversos relatos (Brener & Gazzinelli, 1997). Nos dias de hoje, em que a co-infecção com HIV se faz presente, vê-se na literatura número significativo de relatos descrevendo um padrão clínico nada usual, com acometimento do sistema nervoso central (Castillo *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 1997); sugeriu-se, inclusive, que essas manifestações representariam evento definidor de caso de Aids (Albrecht, 1997). Contudo, o equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro é a regra, mesmo nos casos de co-infecção (Cruz *et al.*, 2004).

Sustentado pelas descrições de Gaspar Vianna, que chamou a atenção para a destruição de células ganglionares na vizinhança dos pseudocistos rompidos durante a fase aguda, Koeberle constrói um raciocínio partindo da observação de que a reação inflamatória seria conseqüente aos produtos da desintegração parasitária, resultando nas lesões degenerativas observadas após a ruptura da célula parasitada. A idéia geral dos patologistas de então era que o processo agudo desapareceria sem deixar vestígios, daí a ausência de manifestações clínicas. Contudo, educado que foi dentro de um sistema germânico, para Koeberle os conceitos e palavras eram regidos pela exatidão: defendeu que a aparente ausência de seqüelas após a fase aguda era enganosa, argumentando que o sistema autônomo nervoso era destruído pela inflamação aguda, causando redução significativa das células ganglionares do sistema nervoso central ou periférico, e por essa razão não seriam visualizadas e passariam despercebidas mesmo por exímios patologistas (Köberle, 1956, 1963). Sua hipótese era que a infecção aguda chagásica seria comparável à poliomielite, doença em que, após a inflamação aguda, as lesões das células nervosas seriam responsáveis pelas manifestações de paralisia. Essa proposição fundamentou-se nos seus extraordinários estudos em que realizou a contagem de células ganglionares em cortes seriados do trato digestivo, mostrando que a idade era inversamente proporcional ao número de células ganglionares no plexo mioentérico do esôfago, em concordância com outros autores, que denominaram esse fenômeno fisiológico de "presbiesôfago". A análise de mais de duzentas necropsias de indivíduos chagásicos mostrou-se irregular e variável, e revelou que o aparecimento de megas ocorreria quando ocorresse perda neuronal de 90% (Rezende, 2000). Koeberle pondera sobre a necessidade de se fazer uma avaliação funcional da motilidade do

esôfago para se chegar a uma conclusão definitiva, bem como para analisar os dados à luz de diferenças regionais. Nesse sentido, estudos imuno-histoquímicos indicaram que alguns neuropeptídeos produzidos por neurônios e fibras nervosas do plexo mioentérico encontram-se em níveis elevados ou reduzidos na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, e que o desbalanço entre os neurotransmissores teria papel importante na alteração da motilidade verificada nos megas (Maifrino, Liberti & Souza, 1999; Maifrino *et al.*, 1999; Silveira *et al.*, 2008).

Koeberle (1957) conclui que a denervação é um elemento indispensável para o aparecimento dos megas, mas seu desenvolvimento depende de um conjunto de ações: a localização, a intensidade e a sensibilidade do órgão por ela afetado. Usando um sistema de cortes seriados, sugeriu que a produção de uma neurotoxina pelas formas amastigotas, com atividade em distâncias curtas e em altas concentrações, seria responsável pelas lesões observadas no sítio da ruptura do pseudocisto. Quando apresentou sua teoria, a comunidade científica reagiu negativamente e fez críticas contundentes (Rezende, 2000), apesar da confirmação por outros autores (Tafuri & Brener, 1966; Andrade & Andrade, 1966; Okumura, 1967; Tafuri, Maria & Lopes, 1971).

Também baseando-se na evidência morfológica de arterite necrotizante, Koeberle sugere que as lesões também pudessem ser decorrentes de "reações alérgicas", mas com um significado ainda desconhecido à época. Alguns anos mais tarde, um dos marcos da importância da resposta imunológica na patologia da doença de Chagas foi a identificação de anticorpos anti-EVI (Cossio *et al.*, 1974), que originou diversas publicações relacionadas à implicação de um mecanismo auto-imune na indução das lesões causadas pelo *T. cruzi* (Acosta & Santos-Buch, 1985; Imperio Lima *et al.*, 1986; Fernandez, Hontebeyrie-Joskowicz & Said, 1992; Cunha-Neto *et al.*, 1996; Golgher & Gazzinelli, 2004).

A patologia tornou-se uma ciência a partir dos estudos desenvolvidos por Virchow, na Alemanha, e Bichat, na França, no século XIX, contribuindo enormemente para uma nova visão da doença e dos processos fisiopatológicos nela envolvidos. Passou a representar a expressão morfológica do quadro clínico do paciente, e trouxe consigo um conceito de ciência integrada, mais tarde acoplado à microbiologia, à imunologia, à bioquímica e à genética, que acrescentaram novas abordagens, inclusive o estudo de doenças com métodos de experimentação. A patologia evoluiu tecnicamente com o acréscimo da microscopia eletrônica, que, surgida nos anos 50 do último século, fez a aproximação da morfologia com organelas e moléculas diversas. As observações morfológicas oriundas dessa tecnologia mostraram que muitas moléculas presentes na membrana do *T. cruzi* eram importantes para a interação do parasita com a célula hospedeira (Souza, 2008). A biologia molecular foi a esfera que mais contribuiu para a revolução da visão sobre a ciência. No novo milênio, genomas inteiros, inclusive o humano, já foram seqüenciados, fazendo explodir um imenso leque de possibilidades para a ciência, agora com um linguajar transformado na ciência das 'ômicas': a primeira foi a genômica, que abrange o estudo da estrutura de funcionamento dos genes de um organismo. Por analogia, a proteômica estuda as proteínas derivadas de um genoma; metabolômica, fisionômica etc. são hoje termos fáceis de encontrar entre aqueles preocupados em investigar as interações moleculares e suas implicações na fisiologia dos genomas.

A patologia de ontem, baseada apenas na observação morfológica, transformou-se na patologia molecular, entremeada e integrada a outras ciências, acoplando ferramentas metodológicas como a imuno-histoquímica, a microscopia intravital ou confocal, a hibridação e a PCR *in situ*, o que permitiu a identificação de vários eventos moleculares envolvidos na etiopatogenia de processos degenerativos, resultando em ampliação de conceitos e mudança de paradigmas.

Um exemplo disso está no questionamento que Koeberle fez sobre o tempo em que os parasitas 'podem' ou 'devem' circular, com uma sutileza que confirma a perspicácia do patologista: 'poder' circular indicaria o tempo em que o parasito sobreviveria sem ser importunado pela resposta inflamatória; 'dever' circular sugere uma fase metabólica necessária para que o parasita pudesse entrar na célula. Neste último caso, Koeberle e outros pesquisadores chamaram a atenção para a possível existência de produtos originados do metabolismo que atuariam como sinalizadores da proximidade de uma célula. Segundo seu raciocínio, fundamentado na observação microscópica de formas de cultura do parasita, a tripomastigota necessitaria de carboidratos para sua sobrevivência, e algum produto circulante informaria ao parasita a proximidade de uma célula contendo glicogênio. Esse disparador metabólico conduziria o parasita à perfuração do epitélio capilar e, então, da membrana plasmática da célula do hospedeiro. Foram necessários mais vinte anos para se confirmar, através de estudos bioquímicos, que mucinas representam as principais glicoproteínas de superfície do parasita e que os resíduos de açúcar permitem a interação das tripomastigotas com as células de mamíferos (revisto por Villalta *et al.*, 2009).

Com base apenas na evidência morfológica, o espírito observador de pesquisadores como Fritz Koeberle descortinou o início de uma nova era da patologia: as precisas descrições clínicas de Carlos Chagas, associadas à riqueza de detalhes dos trabalhos anatomopatológicos iniciados por Gaspar Vianna e Magarinos Torres, traçaram caminhos para uma nova forma de pensar na fisiopatogenia de doenças e orientaram os avanços tecnológicos de que hoje nos beneficiamos.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. M. & SANTOS-BUCH, C. A. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation*, 71(6): 1.255-1.261, 1985.

ALBRECHT, H. Redefining Aids towards a modification of the current Aids case definition. *Clinical Infectious Diseases*, 24: 64-74, 1997.

ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. Chagas' disease and neuron changes in Auerbach's plexus: experimental study in mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 8(5): 219-224, 1966.

BRENER Z, GAZZINELLI R T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *International Archives of Allergy and Immunology*, 114: 103-110, 1997.

COSSIO, P. M. *et al.* Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gammaglobulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 49: 13-21, 1974.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Autoimmunity in Chagas' disease: identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *Journal of Clinical Investigation*, 98(8): 1.709-1.712, 1996.

CASTILLO, M. *et al.* Aids and Chagas disease with central nervous system tumor-like lesion. *American Journal of Medicine*, 88: 693-694, 1990.

CRUZ, A. M. *et al.* Long-term follow-up of co-infected HIV and *Trypanosoma cruzi* Brazilian patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(12): 728-733, 2004.

FERNANDEZ, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. & SAID, G. Autonomic neuropathy and immunological abnormalities in Chagas' disease. *Clinical Autonomic Research Society*, 2: 409-412, 1992.

FERREIRA, M. S. *et al.* Reactivation of Chagas' disease in patients with Aids: report of three new cases and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 25(6): 1.397-1.400, 1997.

GOLGHER, D. & GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, 37(5): 399-409, 2004.

IMPERIO LIMA *et al*. Persistence of polyclonal B-cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *Journal of Immunology*, 137(1): 353-357, 1986.

KÖBERLE, F. Chagas disease: a disease of the peripheral autonomic nervous system. *Wien Klin Wochenschr*, 68(17): 333-339, 1956.

KÖBERLE, F. Enteromegaly. *Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*, 96(5-6): 244-259, 1957.

KOEBERLE, F. Enteromegaly and cardiomegaly in Chagas disease. *Gut*, 4: 399-405, 1963.

KÖBERLE, F. & NADOR, E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Revista Paulista de Medicina*, 47: 643-661, 1955.

MAIFRINO, L. B.; LIBERTI, E. A. & SOUZA, R. R. Vasoactive-intestinal-peptide- and substance-P-immunoreactive nerve fibres in the myenteric plexus of mouse colon during the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93(1): 49-56, 1999.

MAIFRINO, L. B *et al*. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(5): 721-725, 1999.

MAZZA, S. Casos agudos benignos de enfermedad de Chagas coprobados en la provincia de Jujuy. *Mepra*, 17: 3-11, 1934.

OKUMURA, M. Contribution to the study of myenteric plexus neurons lesions of the colon in experimental Chagas disease in albino mice (*Mus musculus*). *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, 22(4): 192-203, 1967.

REZENDE, J. Caminhos da medicina: Fritz Koeberle e seus estudos sobre a doença de Chagas, 2000. Disponível em: <usuarios.cultura.com.br/jmrezende/Koeberle.htm>. Acesso em: 28 maio 2009.

SILVEIRA, A. B. *et al*. Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(11): 1.154-1.156, 2008.

SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes: a historical view. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(4): 313-325, 2008.

TAFURI, W. L. & BRENER, Z. Lesions of the autonomic nervous system in albino mice in experimental trypanosomiasis cruzi in the acute phase. *Hospital*, 69(2): 371-383, 1966.

TAFURI, W. L.; MARIA, T. A. & LOPES, E. R. Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients: electron microscopy study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 13(2): 76-91, 1971.

TORRES, M. Estudo do miocárdio na moléstia de Chagas (forma aguda). I. Alterações da fibra muscular cardíaca. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 9: 114-134, 1917.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da 'molestia de Carlos Chagas' (esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3: 276-293, 1911.

VILLALTA, F. *et al*. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitology Research*, 104(6): 1.251-1.260, 2009.